

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



Diplomová práce

Časné změny exprese eNOS a ICAM-1 v aortě myší
po podávání vysokotukové diety.

Early changes in eNOS and ICAM-1 expression in
mice aorta after administration of high fat diet.

Vedoucí diplomové práce:

doc. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Hradec Králové 2017

Tereza Stehlíková

Děkuji svému školiteli doc. PharmDr. Petru Nachtigalovi, Ph.D. za vstřícný přístup, cenné rady a připomínky a za pomoc při sestavování této diplomové práce. Poděkování dále zasluhují paní laborantka Renata Zdanovcová za uvedení do imunohistochemických metod a nedocenitelnou pomoc s experimentální částí práce a Mgr. Kateřina Blažíčková, Ph.D. za neobyčejně vstřícný přístup a rady. Závěrem chci vyjádřit své díky celé katedře biologických a lékařských věd za vytvoření velmi příjemného a přátelského pracovního prostředí.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Školitel: doc. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Kandidát: Tereza Stehlíková

Název diplomové práce: Časné změny exprese eNOS a ICAM-1 v aortě myší po podávání vysokotukové diety

Cíl práce: Cílem práce bylo sledovat změny v expresi eNOS a ICAM-1 v aortě myší po podávání vysokotukové diety v porovnání s kontrolní skupinou myší, jež byla krmena standardní dietou.

Metoda: Pro experiment byly použity samice myší kmene C57BL/6J. Polovina byla krmena po dobu 3 měsíců vysokotukovou dietou s obsahem 1,25 % cholesterolu 40 % tuku, druhá polovina, která sloužila jako kontrolní, byla po celou dobu krmena běžnou stravou. Imunohistochemická detekce byla provedena pomocí nepřímé trojstupňové metody avidin-biotin komplexu.

Výsledky: Exprese eNOS byla výrazná a dobře pozorovatelná na cévním endotelu, avšak bez rozdílu mezi kontrolní a experimentální skupinou. ICAM-1 exprese byla také detekována pouze na cévním endotelu v aortě, ale nebyl zde prokázán signifikantní rozdíl v expresi ICAM-1 mezi oběma skupina.

Závěr: Podávání vysokotukové diety s obsahem 1,25 % cholesterolu a 40 % tuku po dobu 3 měsíců nemělo vliv na expresi eNOS a ICAM-1 v aortě myší. Výsledky této práce tedy naznačují, že použití těchto myší a tohoto experimentálního designu nevede k manifestaci dysfunkce endotelu z pohledu morfologického nálezu.

Klíčová slova: eNOS, ICAM-1, endotel, imunohistochemie

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove

Department of Biological and Medical Sciences

Consultant: Associate Professor, Petr Nachtigal, Ph.D.

Candidate: Tereza Stehlíková

Title of Thesis: Early changes in eNOS and ICAM-1 expression in mice aorta after administration of high fat diet

Background: The aim of this thesis was to observe changes in eNOS a ICAM-1 expression after administration of high fat diet in comparison with the control group, which was fed with the chow diet.

Method: C57BL/6J female mice were used for the experiment. 6 mice were fed with the high fat diet (experimental group), which contains 1,25 % of cholesterol and 40 % of fat, for the period of 3 months. Six mice (representing control group) were fed with the chow diet the whole time. Immunohistochemical analysis was performed by means of avidin-biotin complex method.

Results: The expression of eNOS was visible on the vascular endothelium but there were no differences between the control group and the experimental group. Similarly, ICAM-1 expression was detected only in endothelium in aorta but no differences in the expression between control and experimental group were visible.

Conclusions: Administration of high fat diet with 1,25 % of cholesterol and 40 % of fat for 3 months had no effect on the expression of eNOS and ICAM-1 in mice aorta. Results of this thesis indicate that using these mice and this experimental design do not lead to the manifestation of the endothelial dysfunction from the perspective of morphological findings.

Key words: eNOS, ICAM-1, endothelium, immunohistochemistry

Obsah

1	Použité zkratky	8
2	Úvod	10
3	Histologie cév	11
3.1	Arterie	11
3.2	Vény	12
3.3	Kapiláry	13
4	Endotel a jeho funkce	15
5	Endotelová NO syntáza	18
5.1	Struktura eNOS	18
5.2	eNOS a její vliv na endotel	20
5.3	Regulace aktivity eNOS	21
6	Dysfunkce endotelu	23
6.1.1	Ovlivnitelné rizikové faktory	23
6.1.2	Neovlivnitelné rizikové faktory	24
6.2	Adhezní molekuly	26
6.2.1	Selektiny	28
6.2.2	Integriny	28
6.2.3	Kadheriny	29
6.2.4	Imunoglobulinový typ	29
6.2.4.1	VCAM-1	29
6.2.4.2	ICAM-1	30
6.3	Cytokiny	33
6.3.1	Interleukiny	33
6.3.2	Tumor nekrotizující faktory	33
6.3.3	Interferony	33
6.4	C-reaktivní protein	34
6.5	Cholesterylester transfer protein	34
7	Zvířecí modely	35
7.1	ApoE-deficientní myši	35
7.2	LDLr-deficientní myši	37
7.3	ApoE/LDLr dvojité deficientní myši	37
7.4	Koncept 3R	37
8	Imunohistochemie	38
8.1	Přímá metoda	38

8.2	Nepřímá dvoustupňová metoda.....	38
8.3	Nepřímá trojstupňová metoda	39
8.4	Protilátky v imunohistochemii	40
8.4.1	Monoklonální protilátky	41
8.4.2	Polyklonální protilátky	42
9	Zadání – cíl práce.....	43
10	Experimentální část práce.....	44
10.1	Použitá zvířata a příprava vzorků.....	44
10.2	Imunohistochemie	44
10.3	Pracovní postup	45
10.3.1	Stanovení myší ICAM-1, ABC metoda.....	46
10.3.2	Stanovení myší eNOS, ABC metoda	47
11	Výsledky	49
12	Diskuze	62
13	Závěr	65
14	Seznam obrázků a tabulek	66
15	Zdroje.....	68

1 Použité zkratky

ABC	avidin-biotin complex
Ag	antigen
ApoE	apolipoprotein E
BH ₄	tetrahydrobiopterin
BSA	bovine serum albumin
CETP	cholesteryl transfer protein
CHD	koronární onemocnění srdce
CRP	C-reaktivní protein
DAB	diaminobenzidin
DAG	diacylglycerol
EDRF	endotelový relaxační faktor
eNOS	endotelová NO syntáza
ET-1	endotelin-1
HDL	high-density lipoprotein
Hsp90	heat shock protein 90
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
IFN	interferon
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
iNOS	indukovatelná NO syntáza
IP ₃	inositoltrifosfát
LDL	low-density lipoprotein
MAb	monoklonální protilátka
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát
nNOS	neuronální NO syntáza
PaB	polyklonální protilátka
p-eNOS	fosforylovaná eNOS
PBS	phosphate-buffered saline
PDGF	destičkový růstový faktor
PECAM-1	platelet endothelial cell adhesion molecule-1
ROS	reaktivní kyslíkaté radikály

sICAM-1	solubilní ICAM-1
TGF β	transformující růstový faktor β
TNF	tumor nekrotizující faktor
TxA ₂	tromboxan A ₂
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	vaskulární endotelový růstový faktor
VLA	very late antigen
VLDL	very low-density lipoprotein
vWF	von Willebrandův faktor

2 Úvod

Kardiovaskulární onemocnění (ischemická choroba srdeční, akutní infarkt myokardu, cévní mozková příhoda aj.) jsou aktuálně nejčastější příčinou úmrtí na světě. Těmto chorobám nezřídka předchází ateroskleróza, jež vzniká na podkladě rozvinuté dysfunkce endotelu.

Endotel nám pomáhá zajistit cévní homeostázu, jeho porušení může vést k rozvoji aterosklerózy. Endotelová dysfunkce (potažmo ateroskleróza) vzniká na základě různých faktorů, z nichž některé můžeme ovlivnit (svou stravou, fyzickou aktivitou, celkovým životním stylem), jiné bohužel nikoli. Pro sledování stavu endotelu mohou být využity některé biochemicky či imunohistochemicky stanovitelné markery, jejichž expresi můžeme sledovat v různých modelových situacích (rozličné typy diet, podávání léčivých látek aj.) – v rámci této práce jsme zvolili endotelovou NO syntázu (eNOS) a intercelulární adhezní molekulu-1 (ICAM-1).

eNOS zajišťuje základní funkce endotelu skrze produkci oxidu dusnatého (NO) a působí tedy jako protektivní faktor aterogeneze. Naproti tomu ICAM-1 se účastní rozvoje zánětlivých procesů v cévní stěně, čímž rozvoj aterosklerózy podporuje.

3 Histologie cév

Cévy jsou útvary tvaru trubek zajišťující rozvod krve v těle. Lze je rozdělit do tří základních skupin, těmi jsou arterie (tepny), případně arterioly (tepénky), ty vedou krev směrem od srdce, dále pak vény (žilky), případně venuly (žilky) vedoucí krev k srdci a v poslední řadě kapiláry (vlásečnice), které spojují arterie a vény (výjimečně též cévy stejného typu, příkladem je glomerulus, tento jev pak nazýváme rete mirabile)¹. Stěnu cév obecně tvoří tři vrstvy – tunica intima, tunica media a tunica adventitia, viz Obrázek 1. Podrobněji jsou tyto vrstvy rozebrány níže na příkladu arterií, u ostatních typů cév jsou pak popsány už jen rozdíly od základní charakteristiky, viz Obrázek 2.

3.1 Arterie

Arterie lze rozdělit na elastické a svalové, případně smíšené. Příkladem elastické arterie je aorta včetně některých částí jejích výstupních cév. Arterie svalové tvoří převážnou část arterií v těle. Jako smíšené arterie pak označujeme ty, u nichž dochází k přechodu elastického úseku ve svalový, příkladem je arteria carotis².

Tunica intima

Vnitřní vrstva, tunica intima, je tvořena primárně endotelem, což je příklad jednovrstevného dlaždicového epitelu. Jedná se o tzv. nepravý epitel, neboť je vytvářen z mesenchymu, nikoli ze zárodečných listů, jak je běžné¹. Dále se zde nachází subendotelová vrstva, jež je tvořena kolagenními a elastickými vlákny. Vzhled a složení subendotelové vrstvy jsou proměnlivé charakteristiky závislé na věku. Cévy dětí disponují jen velmi tenkou subendotelovou vrstvou. V dospělosti se zde začínají objevovat buňky hladké svaloviny z tunica media, jejichž cílem je produkce extracelulární matrix, což má za následek ztlustění vnitřní vrstvy. Na mikrofibrily obsažené v extracelulární matrix se v případě poranění váže von Willebrandův faktor (vWF). Arterioly obsahují ještě Weibel-Paladeho tělíska, která skladují a uvolňují vWF, P-selektin, interleukin-8 a další proteiny mající vliv na zástavu krvácení či rozvoj zánětlivých procesů³.

Tunica media

Nejsilnější vrstvou je cirkulárně uspořádaná tunica media, jež je tvořena především hladkou svalovinou. Základní jednotkou je svalová buňka, myocyt, která má v případě hladké svaloviny spirálovitý tvar a na rozdíl od svalových buněk příčně pruhovaného svalstva disponuje pouze jedním jádrem. Mezibuněčnou hmotu, která je produktem buněk hladké svaloviny, tvoří vlákna – elastická a kolagenní typu III, ta obsahují oproti nejčastěji zastoupenému kolagenu typu I více proteoglykanů. Tato vlákna vytváří retikulární síť⁴. U svalových arterií rozlišujeme ještě dvě elastické blanky – membrana elastica interna, která tvoří předěl mezi tunica intima a tunica media, a membrana elastica externa, která tvoří vrstvu mezi tunica media a tunica externa, tu arterioly většinou postrádají. Elastické arterie disponují výrazně větším množstvím elastických blan (20-50), proto u nich výše zmíněné mezivrstvy nerozlišujeme².

Tunica adventitia

Tunica adventitia (nazývána též tunica externa) je tvořena vazivem s obsahem kolagenních a elastických vláken a proteoglykanů. Na rozdíl od tunica media je uspořádána longitudinálně, podélně. Na rozmezí tunica media a adventitia se nachází cévy vyživující cévní stěnu – vasa vasorum. Cévní stěna tepen je totiž příliš silná a její potřeby tak nepokryjí živiny, které se do ní dostanou difúzí z protékající krve. Cévy jsou v místech této zevní vrstvy také inervovány, nalezneme zde vlákna sympatiku^{4,5}.

3.2 Vény

Vény můžeme stejně jako tepny rozdělit na dvě základní skupiny – běžné (fibromuskulární) a svalové (muskulární). Tunica intima vén je tenká (s výjimkou velkých žil). Zdvojením intimy vznikají chlopně, které pomáhají zajistit tok krve do srdce a zabraňují zpětnému vracení krve v místech, kde krev proudí proti směru působení gravitace. Tunica media je výrazně tenčí než u tepen, buňky hladkého svalstva jsou zde zastoupeny pouze malými shluky, nikoli souvislou vrstvou.

Tunica adventitia je naopak v případě vén výrazně vyvinutá, u některých žil (typicky v. portae, v. cava inferior) se může jednat dokonce o nejsilnější vrstvu cévní stěny⁴.

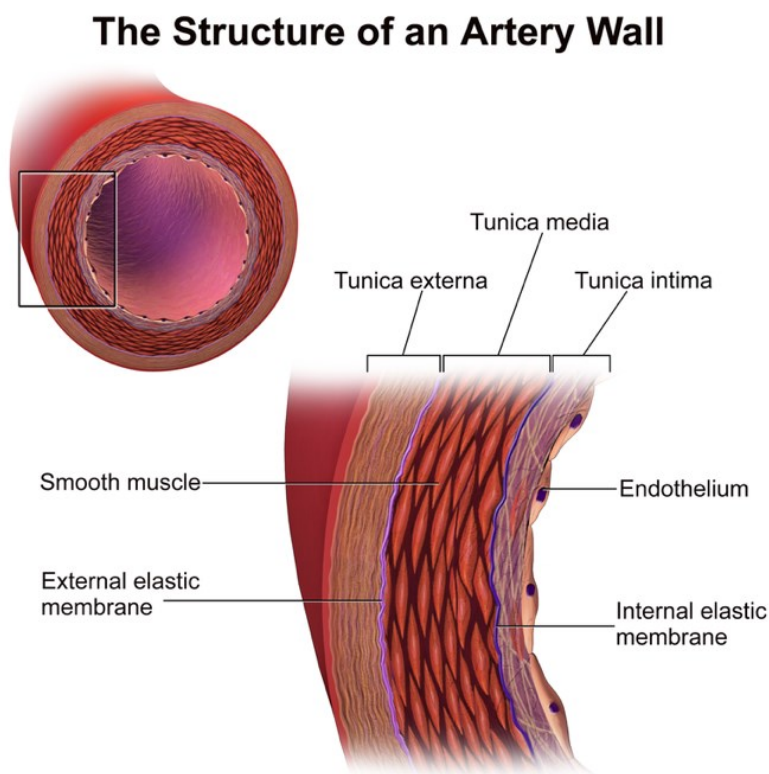
3.3 Kapiláry

Kapiláry jsou tvořeny pouze endotelem a lamina basalis, někdy obsahují též pericyty. Pericyty, nazývané též Rougetovy buňky, jsou buňky, které pokrývají povrch kapilár a oddělují tak pojivovou tkáň od okolí. Díky svým kontraktilním schopnostem mohou částečně simulovat funkci medie. Jejich nedostatek může vést kupříkladu k diabetické retinopatii. Retina má největší zastoupení pericytů v těle. Vlivem různých, dosud ne zcela objasněných vlivů (spekuluje se mimo jiné o vlivu častých hyperglykemických stavů) dochází ke ztrátě pericytů a tvorbě mikroaneurysmatu v kapilárách, což vede ke zvýšení propustnosti cév a rozvoji makulárního edému⁶.

Obrázek 1: Struktura arteriální stěny

Artery. *Wikipedia* [online]. [cit. 2017-01-17]. Dostupný pod licencí Creative Commons na:

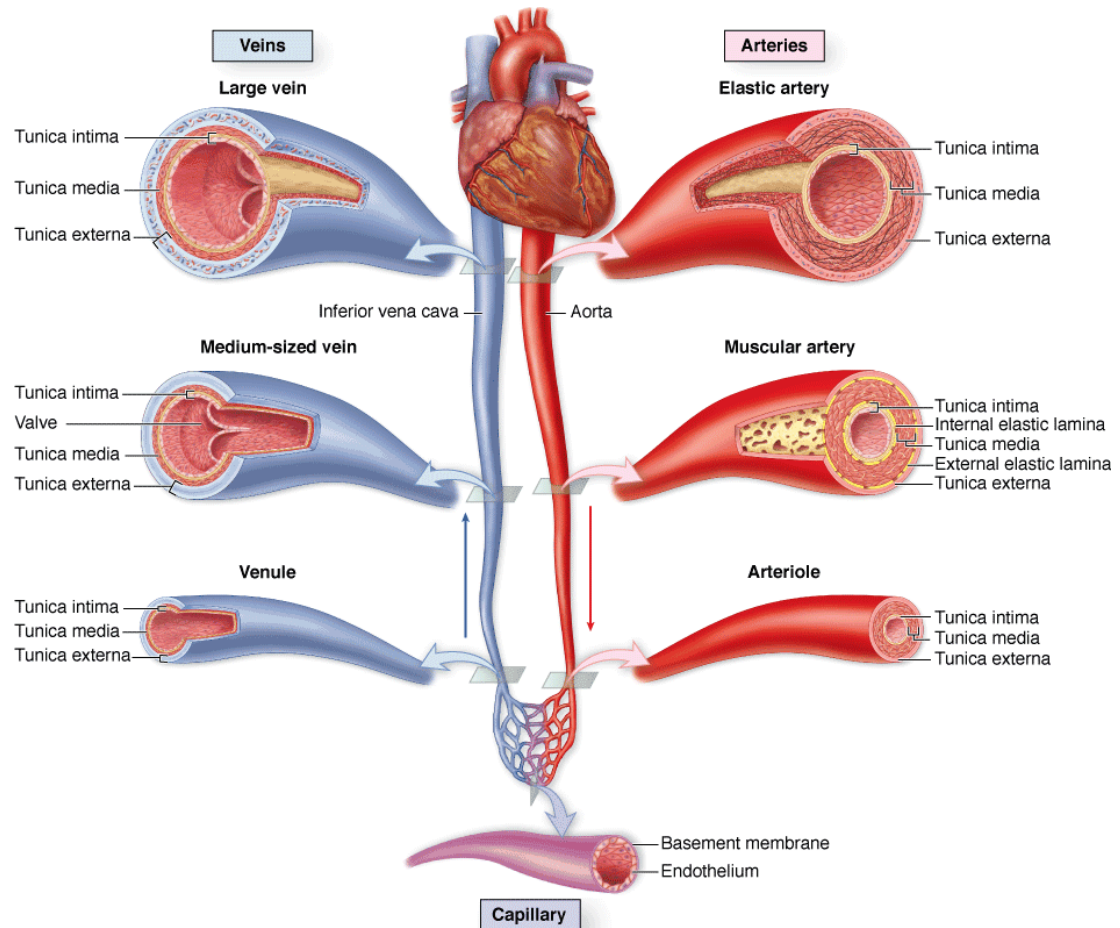
https://en.wikipedia.org/wiki/Artery#/media/File:Blausen_0055_ArteryWallStructure.png



Obrázek 2: Rozdíly ve struktuře cévní stěny arterie, vény a kapiláry

The circulatory system. *Histology and Nano Technology* [online]. [cit. 2017-01-17]. Dostupný na:

<http://histonano.com/books/Junqueira's%20Basic%20Histology%20PDF%20WHOLE%20BOOK/11.%20The%20Circulatory%20System.htm>



Source: Mescher AL: *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas*, 12th Edition: <http://www.accessmedicine.com>
Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.

4 Endotel a jeho funkce

Endotel je příkladem jednovrstevného plochého epitelu, vystýlá všechny krevní a lymfatické cévy včetně těch nejmenších.

Endotel není jen výstelkou, která zajišťuje nesmáčivost cévní stěny. Bylo zjištěno, že po podání acetylcholinu dojde k vazodilataci, je-li cévní stěna neporušená, případně k vazokonstrikci, je-li endotelová vrstva narušená. Toto zjištění vedlo k objevu endotelového relaxačního faktoru (EDRF), jenž byl později identifikován jako oxid dusnatý (NO). Na vazodilataci se spolu s NO podílí též prostacyklin (PGI₂), bradykinin, natriuretické peptidy či hyperpolarizační faktor. Proti tomu působí vazokonstrikci vyvolávající činitelé, především endotelin-1 (ET-1), jehož uvolňování je řízeno působením angiotenzinu II, interleukinů, vazopresinu či cytokinů. Již v raných fázích aterosklerózy je sníženo působení NO a tím podpořeno působení vazokonstrikčních látek⁷. Rozlišujeme dva typy receptorů pro ET-1: ET_A a ET_B.

Receptor ET_A je lokalizován na povrchu buněk tunica media, receptor ET_B pak na povrchu endotelových buněk. Působením angiotenzinu II a dalších výše zmíněných činitelů dochází ke zvýšení exprese pre-proendotelin-1 m-RNA, což vede k produkci pre-proendotelinu-1 a po štěpení přes proendotelin-1 vzniká endotelin-1. Vazba ET-1 na receptor ET_A vede k aktivaci fosfolipázy a tvorbě inositoltrifosfátu (IP₃) a diacylglycerolu (DAG). IP₃ způsobí vyšší uvolňování vápenatých iontů a DAG otevření vápenatých kanálů. V konečném důsledku tedy dojde ke zvýšení intracelulární koncentrace vápenatých iontů, což má za následek kontrakci buněk hladké svaloviny.

Po obsazení receptoru ET_B dojde naopak k uvolnění vazodilatačních činitelů, především NO. NO se uvolňuje z aminokyseliny L-arginin za působení NO syntáz.

Dále hraje endotel důležitou roli v hemostáze, především skrze syntézu vWF a jeho skladování ve Weibel-Paladeho tělískách. Tento glykoprotein pak působí agregaci trombocytů a v další fázi hemostázy stabilizuje koagulační faktor VIII. Uvolňování vWF z endotelových buněk vyvolá působení např. histaminu či trombinu skrze zvýšení koncentrace vápenatých iontů. Stejně tak mohou zvýšit uvolňování vWF adrenalin či vazopresin formou exocytózy nebo stavy hypoxie⁸.

Endotel se dále podílí na angiogenezi, a to za pomoci růstových faktorů, především vascular endothelial growth factor (VEGF, vaskulární endotelový růstový

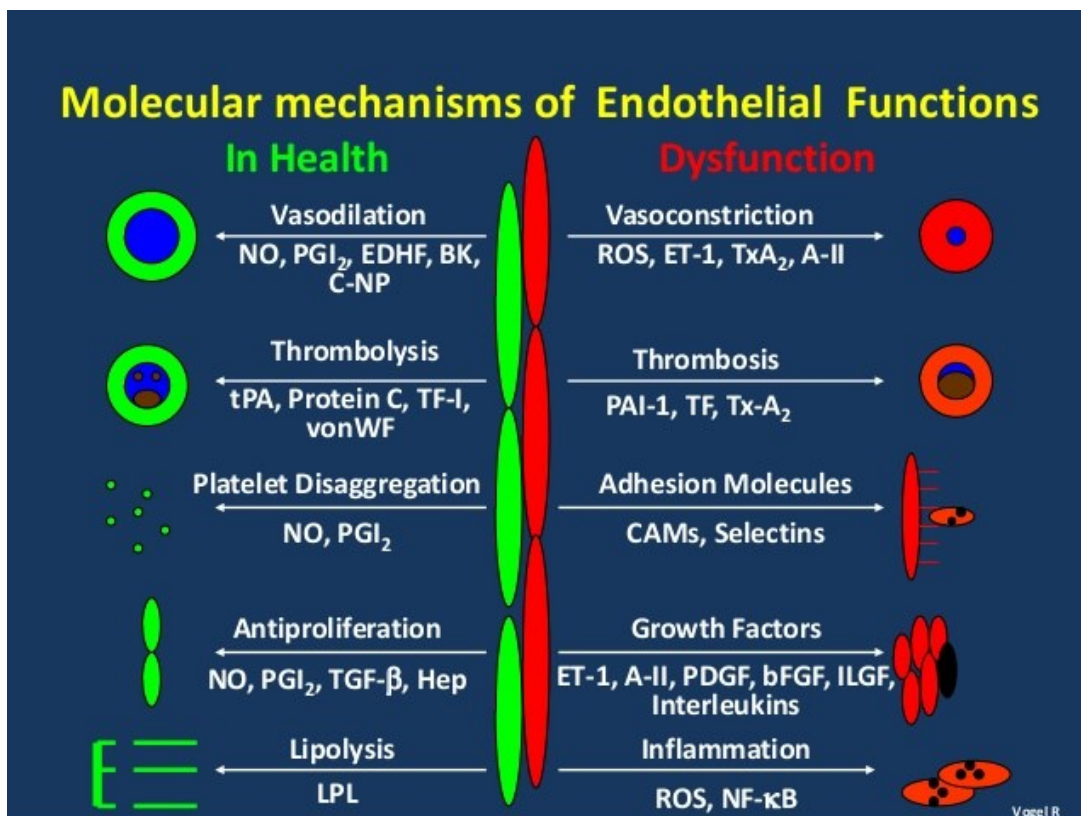
faktor), platelet derived growth factor (PDGF, destičkový růstový faktor) a transforming growth factor β (TGF β , transformující růstový faktor β). Zasahuje také do procesu zánětu skrze produkci adhezních molekul jako jsou selektiny či imunoglobulinové molekuly VCAM a ICAM (více viz kapitola 5.1)⁹. Shrnutí základních funkcí a dysfunkcí endotelu nabízí Obrázek 3.

Obrázek 3: Funkce a dysfunkce endotelu:

1. Za fyziologických podmínek produkuje endotel NO, PGI₂, EDHF (hyperpolarizační faktor), BK (bradykinin) či C-NP (natriuretický peptid C), jež vedou k vazodilataci. Působení ROS (reaktivní kyslíkaté radikály), ET-1, TxA₂ (tromboxan A₂), či A-II (angiotenzin II) má za následek naopak vazokonstrikci.
2. tPA (plazminogen), vWF, protein C a TF-I (inhibitory tkáňového faktoru) vedou k trombolýze, a tak brání rozvoji trombózy. Opačným efektem působí PAI-I (inhibitor aktivátoru plazminogenu, TF (tkáňový faktor) a TxA₂.
3. Agregaci trombocytů potlačují NO a PGI₂. Adhezní molekuly (více viz kapitola 5.2) vedou k přilnutí a prostupu leukocytů s následným rozvojem zánětlivé reakce. K rozvoji zánětu vede též působení ROS a NF-κB (nukleární faktor kappa B), jenž má vliv na expresi genů, které hrají roli v imunitních a zánětlivých dějích.
4. Produkce LPL (lipoproteinová lipáza) vede k lipolýze.
5. Proti antiproliferativnímu vlivu NO, PGI₂ či TGF-β působí opačným efektem ET-1, angiotenzin II, PDGF, bFGF (bazický fibroblastický růstový faktor), IL či ILGF (inzulin-like růstový faktor).

Endothelial dysfunction in the Indian scenario. *SlideShare* [online]. [cit. 2017-01-26]. Dostupný na:

<http://www.slideshare.net/heartsense/endothelial-dysfunction-in-indian-scenario>



5 Endotelová NO syntáza

NO syntázy jsou kódovány celkem třemi geny, rozlišujeme pak nNOS (neuronální NO syntáza, gen je uložen na 12. chromozomu), iNOS (indukovatelná NO syntáza, gen je uložen na 17. chromozomu) a eNOS (endotelová NO syntáza, gen je uložen na 7. chromozomu). Všechny tři typy pracují až po vazbě na kalmmodulin, bílkovinu schopnou vázat vápenaté ionty, ale iNOS jako jediná není závislá na zvýšené koncentraci těchto iontů^{7,10,11}. eNOS a nNOS produkují určité množství NO kontinuálně, nazýváme je konstitutivní; naproti tomu iNOS potřebuje k aktivaci zánětlivý podnět (např. cytokiny), nazýváme ji indukovatelná¹².

5.1 Struktura eNOS

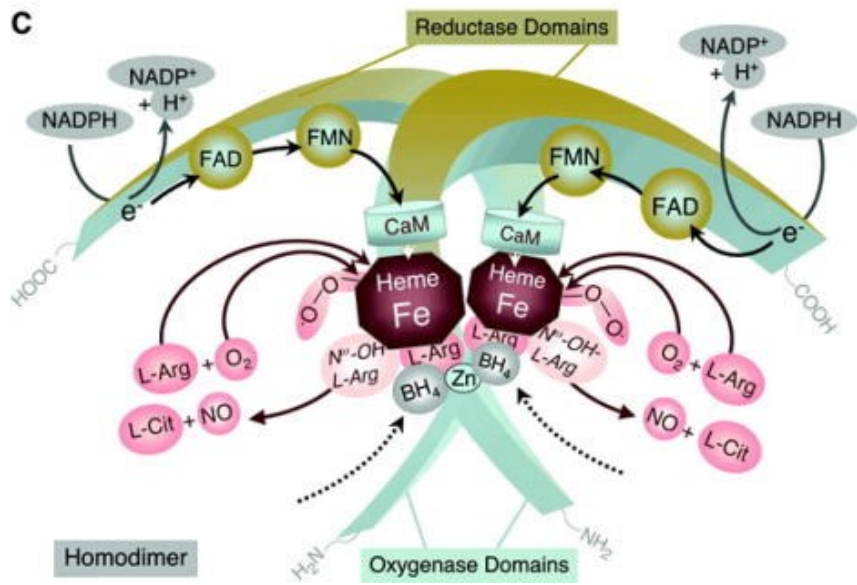
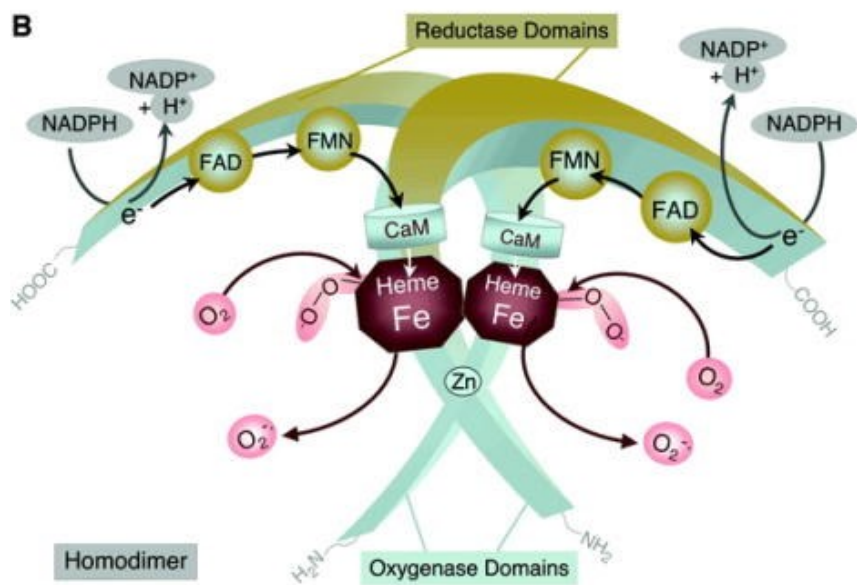
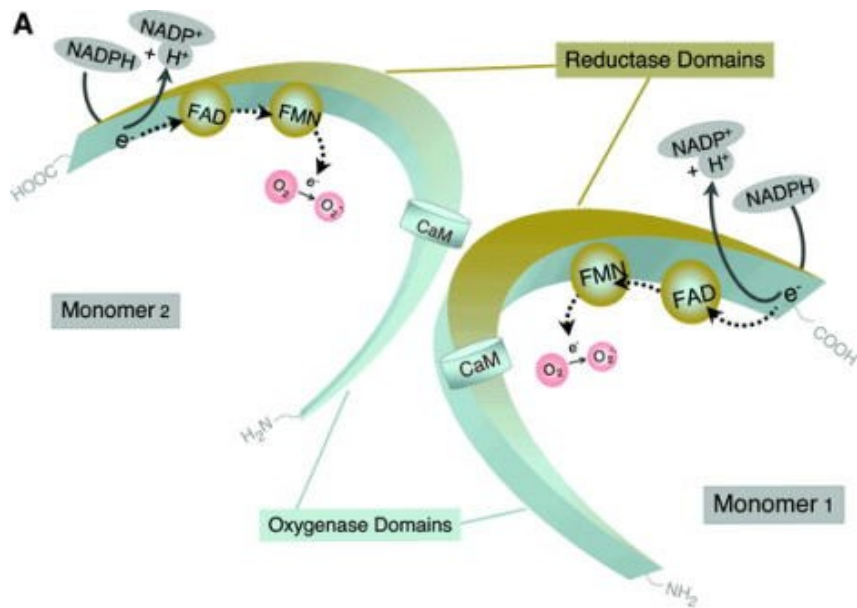
Molekula eNOS je tvořena dimerem. Každý monomer je složen z reduktázové a oxygenázové domény. Reduktázová doména zajišťuje vazbu s nikotinamidadeninukleotidfosfátem (NADPH), flavinmononukleotidem (FMN) či flavinadeninukleotidem (FAD). Oxygenázová doména má na starost vazbu tetrahydrobiopterinu (BH₄), kyslíku či L-argininu. Oxygenázová část také nese molekuly hemu. Samotné monomery nejsou schopny vázat BH₄ či L-arginin, tudíž nejsou schopny produkovat NO. Přítomný hem umožňuje interakce mezi oxygenázovou a reduktázovou doménou, čímž podporuje vznik dimeru. V místě spojení monomerů je vázán zinek¹³. Vznik dimeru a produkci NO shrnuje Obrázek 4.

Obrázek 4: Struktura eNOS¹³.

A: Monomerní jednotky, složené ze dvou domén, vážou kalmmodulin (CaM). Na reduktázové doméně dochází k transportu elektronů mezi NADPH, FAD a FMN.

B: Molekuly hemu zprostředkují interakci mezi monomery za vzniku dimeru. V místě spojení je vázán zinek. Hem umožňuje transfer elektronů z opačného monomeru.

C: Při zapojení BH₄ a L-argininu dochází k syntéze NO. Jako vedlejší produkt vzniká L-citrulin.



Všechny výše jmenované kofaktory jsou nezbytné pro správnou funkci eNOS. BH_4 je v organismu tvořen z guanosintrifosfátu (GTP) za účasti NADPH¹⁴. Za fyziologických podmínek produkuje eNOS primárně NO a v menší míře pak velmi reaktivní superoxidový aniont O_2^- . Při nedostatku BH_4 (například jeho oxidací na biopterin vlivem působení oxidačního stresu) dochází k rozpadu dimeru na monomery, což vede ke snížení produkce NO a naopak ke zvýšení produkce kyslíkatých radikálů¹⁵. NADPH, FAD a FMN působí jako oxidačně-redukční systémy, poskytují elektrony, které hem využívá k redukci a aktivaci molekul kyslíku¹³.

5.2 eNOS a její vliv na endotel

Jak již bylo zmíněno výše, základní funkcí eNOS je produkce NO.

Vzniklý NO stimuluje činnost guanylátcyklázy, jejímž působením vzniká z guanosintrifosfátu (GTP) cyklický guanosinmonofosfát (cGMP). Výsledkem je aktivace proteinkinázy, která vede přes fosforylaci proteinů ke snížení koncentrace intracelulárního vápníku. Vlivem tohoto procesu pak v konečném důsledku dochází k dilataci cév¹⁶.

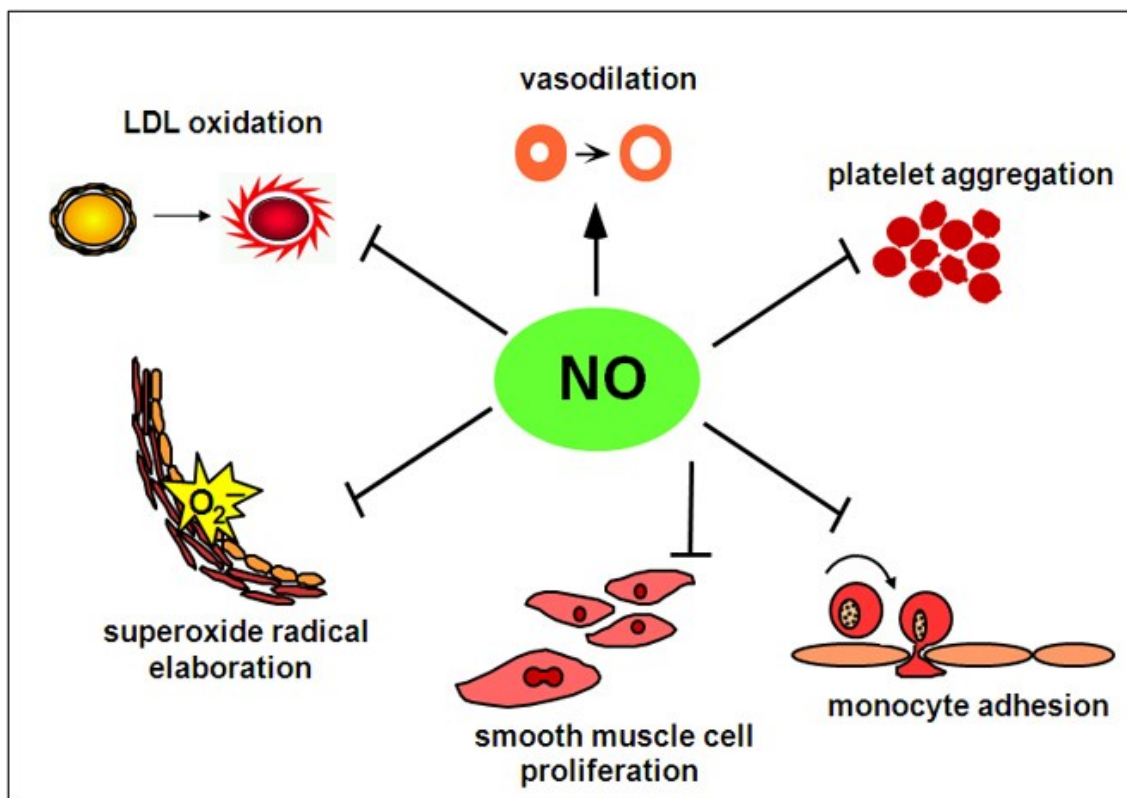
NO má také schopnost regulovat exocytózu v různých fyziologických procesech, mimo jiné i v procesu aktivace trombocytů. Inhibicí exocytózy brání jejich agregaci, působí tedy proti rozvoji trombotických stavů¹⁷. Další účinky NO zobrazuje Obrázek 5.

Nedostatečná exprese eNOS vede ke snížení produkce NO, působí tedy jako jedna z příčin rozvoje endotelové dysfunkce. Nicméně dysfunkce endotelu může vyvolat i nadměrná exprese eNOS, neboť působí redukci O_2 na O_2^- , což může při nadbytku O_2^- zapříčinit zvýšenou tvorbu peroxidu vodíku. Ten může způsobit transkripční a post-transkripční změny eNOS¹⁸.

Obrázek 5: Účinky NO: Působení NO má za následek vazodilataci, snížení agregace trombocytů, přilnutí a prostupu buněk imunitního systému, uvolňování reaktivních radikálů, oxidace LDL a proliferace buněk hladké svaloviny.

Science of Nitric Oxide- What Nitric Oxide does for the health and wellness of our cardiovascular system, according to Dr. Rainer Böger, M.D. *Arginine Cardio* [online]. [cit. 2017-04-10]. Dostupný na:

<https://www.argininecardio.com/science-of-nitric-oxide.php>



5.3 Regulace aktivity eNOS

Jak bylo vysvětleno výše, aktivita eNOS musí být přísně regulována, neboť škodlivý vliv na endotel má jak její nedostatek, tak i její nadbytek.

Kalmodulin je protein, který váže vápenaté ionty, čímž se podílí na regulačních procesech (primárně tam, kde vápenaté ionty působí jako druhý posel). V molekule eNOS zajišťuje přenos elektronů mezi NADPH, FMN a FAD a dále jejich transport k molekule hemu.

Fosforylace vyvolaná zvýšeným napětím vlivem zvýšeného průtoku krve cévou (tzv. „shear stress“) má za následek vytvoření fosforylované eNOS (p-eNOS) a tím zvýšení její aktivity. Tato aktivita je nezávislá na přítomnosti vápenatých iontů. Není však vše tak jednoduché, jak by se mohlo zdát, záleží i na konkrétním místě – zatímco fosforylace na Ser¹¹⁷⁹ vede ke zvýšení aktivity eNOS, fosforylace na Ser⁸⁴⁷ má za následek pokles její aktivity¹⁸.

Jako neúčinnější se ukázala být fosforylace na Ser¹¹⁷⁷ (u člověka) / Ser¹¹⁷⁹ (u skotu) a Thr⁴⁹⁵. Fosforylace zlepšuje tok elektronů mezi oběma doménami eNOS a usnadňuje vazbu CaM, což má za následek zvýšení produkce NO. Za fyziologických okolností k fosforylaci na Ser¹¹⁷⁷ nedochází, spouštěčem je působení VEGF či bradykininu¹⁹.

Heat-shock protein 90 (Hsp90, protein teplotního šoku 90) se uplatňuje, stejně jako všechny proteiny teplotního šoku, při stresových reakcích. Spouštěčem reakce mezi Hsp90 a eNOS může být histamin, zvýšený průtok krve cévou či VEGF. Výsledkem je až trojnásobné zvýšení aktivity eNOS¹⁸.

6 Dysfunkce endotelu

Endotelovou dysfunkci lze charakterizovat jako patologický stav, kdy nejsou jednotlivé aspekty (dilatace vs. kontrakce, proliferace vs. inhibice růstu či prokoagulační vs. antikoagulační působení) v rovnováze. Dysfunkce endotelu může vést k rozvoji aterosklerózy. Jedná se o chronické zánětlivé onemocnění arterií, jež je charakterizováno kumulací lipidů a změnami ve struktuře cévní stěny, a jehož manifestací jsou závažné choroby jako ischemická choroba srdeční (ICHS), ischemická choroba dolních končetin (ICHDK) a jiné. Rizikové faktory pro rozvoj endotelové dysfunkce, potažmo aterosklerózy, shrnuje Tabulka 1²⁰.

Tabulka 1: Rizikové faktory pro rozvoj endotelové dysfunkce

Faktory	
ovlivnitelné	neovlivnitelné
hypertenze	věk
kouření	pohlaví
dyslipidémie	rodinná anamnéza
nadváha či obezita	genetické faktory
diabetes mellitus 2. typu	
fyzická aktivita	
dlouhodobé působení stresu	

6.1.1 Ovlivnitelné rizikové faktory

V prvním sloupci jsou uvedeny faktory, které může pacient ovlivnit svým chováním a jednáním – skrze stravu, pohybovou aktivitu, celkový životní styl.

Hypertenzi může pacient pozitivně ovlivnit nižší spotřebou soli, vhodnou fyzickou aktivitou, regulací tělesné hmotnosti a pravidelným užíváním předepsaných medikamentů. Při nekompenzované hypertenzi dochází k uvolňování kyslíkatých radikálů, následkem čehož klesá produkce NO. Postupně vzrůstá aktivita ET-1, jehož působení vyvolá vazokonstrikci²¹.

Dyslipidémie lze ovlivnit především stravou a užíváním léků, nejedná-li se o familiární hypercholesterolémii, ta spadá mezi faktory genetické. Vysoká hladina LDL

(low-density lipoprotein) je velmi riziková z hlediska aterogeneze. LDL je lipoprotein, jenž v těle zajišťuje transport cholesterolu z jater na periferii. Žádoucí hodnota LDL v krvi je ≤ 3 mmol/l. Při vyšších hodnotách dochází ke kumulaci LDL molekul v tunica intima, především v subendotelové vrstvě. Zde dochází k jejich oxidaci, což má za následek zvýšenou expresi prozánětlivých faktorů, především adhezních molekul ze skupin selektinů, ICAM-1 a VCAM-1 (více viz kapitola 5.1). To vede k hromadění buněk imunitního systému – lymfocytů a monocytů v tunica intima²².

Makrofágy, vzniklé přeměnou z monocytů, pohlcují oxidované molekuly LDL a stávají se pěnovými buňkami, jejichž kumulací vznikají tukové proužky. Dále dochází k přestupu buněk hladké svaloviny z tunica media do tunica intima, a k produkci extracelulární matrix (kolagen, elastin) těmito hladkými svalovými buňkami a vzniká tzv. fibromuskulární plát. V tomto stádiu je proces stále ještě reverzibilní. Po odumření (nekróze či apoptóze) pěnových buněk dochází k tvorbě ateromového plátu s fibromuskulární čepičkou. Aterosklerotický plát může být stabilní či nestabilní. Nestabilní plát hrozí rupturou, jejímž následkem může být akutní infarkt myokardu či cévní mozková příhoda²³. Vývoj aterosklerózy a porovnání s cévou, jež není procesem zasažena, zobrazují Obrázky 6 a 7.

Kouření poškozuje endotel jednak přímo působením na endotelové buňky a jednak nepřímo skrze narušení metabolismu NO. Dochází ke snížení hladin NO, a tedy k poruchám relaxace. Studie prokázaly, že kouření vede ke zvýšení exprese tkáňového faktoru a ke zvýšení agregace destiček a jejich lnutí k endotelu. U kuřáků byly dále zjištěny vyšší koncentrace zánětlivých markerů (cytokinů, C-reaktivního proteinu, adhezních molekul). Svým přímým sympatomimetickým působením vedou látky obsažené v cigaretovém kouři k vazokonstrikci cév^{24,25}.

U pacientů s **diabetes mellitus** 2. typu je našim cílem především předcházet hyperglykemickým stavům. Zvýšená koncentrace glukózy v krvi je totiž provázána oxidačním stresem a zvýšenými hladinami protrombinu a koagulačního faktoru VII. a zkrácením biologického poločasu fibrinogenu²⁶.

6.1.2 Neovlivnitelné rizikové faktory

Naproti tomu neovlivnitelné faktory nelze změnit; jde především o věk, pohlaví, genetické faktory a rodinnou anamnézu. Platí, že riziko rozvoje endotelové dysfunkce, potažmo aterosklerózy roste s věkem a je vyšší u mužů, neboť ženy jsou do menopauzy

chráněny protektivním vlivem estrogenů. Tyto hormony zvyšují počet LDL-receptorů v játrech a tím i vychytávání LDL z krve. Na HDL (high-density lipoprotein), který transportuje cholesterol z periferie do jater, mají opačný efekt, snižují jeho odbourávání inhibicí příslušných jaterních enzymů²⁷.

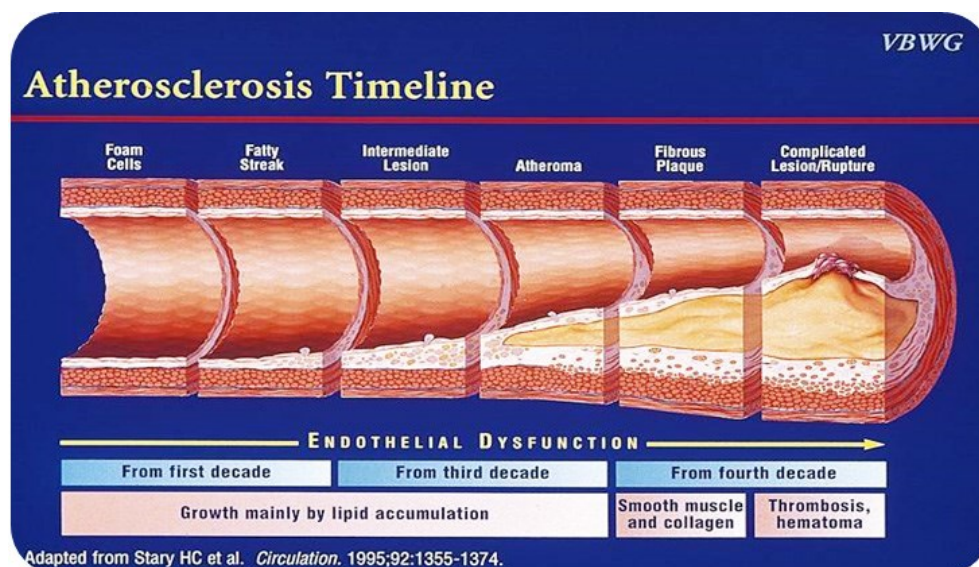
Z genetických faktorů se krom již zmíněné familiární hypercholesterolémie můžeme setkat s hyperhomocysteinémií. Jedná se o onemocnění, které může být způsobeno geneticky podmíněnými poruchami enzymů, které zasahují do metabolismu homocysteinu; stejně tak ale může být vyvoláno nedostatkem některých vitaminů skupiny B (B6, B9, B12), pak se jedná o faktor ovlivnitelný. Homocystein je neesenciální aminokyselina, jež vzniká při metabolismu methioninu. Za využití vitaminů B6, B9 a B12 se homocystein přeměňuje buďto zpět na methionin nebo na cystein. Při deficitu zmíněných vitaminů k přeměně nedochází a homocystein se kumuluje v organismu. Jeho přemíra má za následek snížení tvorby NO, zvýšenou proliferaci buněk hladké svaloviny či zvýšení aktivity trombocytů^{28,29}.

Obrázek 6: Vývoj aterosklerózy: Makrofágy pohlcující oxidované molekuly LDL tvoří pěnové buňky (foam cells), jejichž nakupením vznikají tukové proužky (fatty streak), posléze se tvoří intermediární léze (intermediate lesion) a po odumření pěnových buněk ateromový plát (atheroma). Po aktivaci myocytů a jejich migraci z tunica media do tunica intima vzniká fibrózní plát, fibroaterom (fibrous plaque).

Atherosclerosis: a symptom of endothelial dysfunction. *Itamar medico* [online]. [cit. 2017-01-20].

Dostupný na:

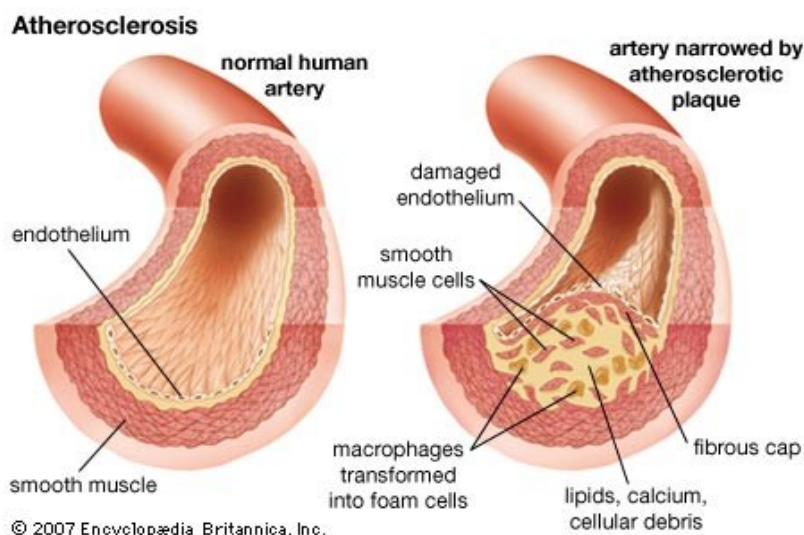
<http://www.itamar-medical.com/atherosclerosis-a-symptom-of-endothelial-dysfunction/>



Obrázek 7: Srovnání zdravé a aterosklerózou postižené cévy: Vlevo je znázorněna zdravá céva s nepoškozeným endotelem, vpravo pak céva postižená aterosklerózou, patrné jsou makrofágy přeměněné do pěnových buněk, lipidy, vápník či fibrózní čepička.

Atherosclerosis. *Encyklopaedia Britannica* [online]. [cit. 2017-01-22]. Dostupné z:

<https://www.britannica.com/science/atherosclerosis>



Případnou endotelovou dysfunkci nám pomáhají zjistit některé biochemicky či imunohistochemicky stanovitelné markery.

6.2 Adhezní molekuly

Adhezní molekuly jsou proteiny, které umožňují interakce mezi buňkami vedoucí k jejich přilnutí, adhezi. Adhezní molekuly se podílí jak na dějích fyziologických (růst a diferenciace buněk), tak i na dějích patologických (zánět, rozvoj aterosklerózy). Důležitou roli mají při imunitní odpovědi organismu, neboť umožňují prostup leukocytů k místu zánětu. Adhezní molekuly rozdělujeme do čtyř základních skupin – selektiny, integriny, kadheriny a molekuly imunoglobulinového typu. Rozdíly ve struktuře jednotlivých skupin adhezních molekul zobrazuje Obrázek 8.

Obrázek 8: Struktura jednotlivých skupin adhezních molekul: Ve všech případech se jedná o transmembránové proteiny, všechny tedy disponují cytoplazmatickou a transmembránovou doménou.

V molekule kadherinů jsou jednotlivé části extracelulární domény spojeny pomocí vápenatých iontů, které tak zajišťují stabilitu molekuly.

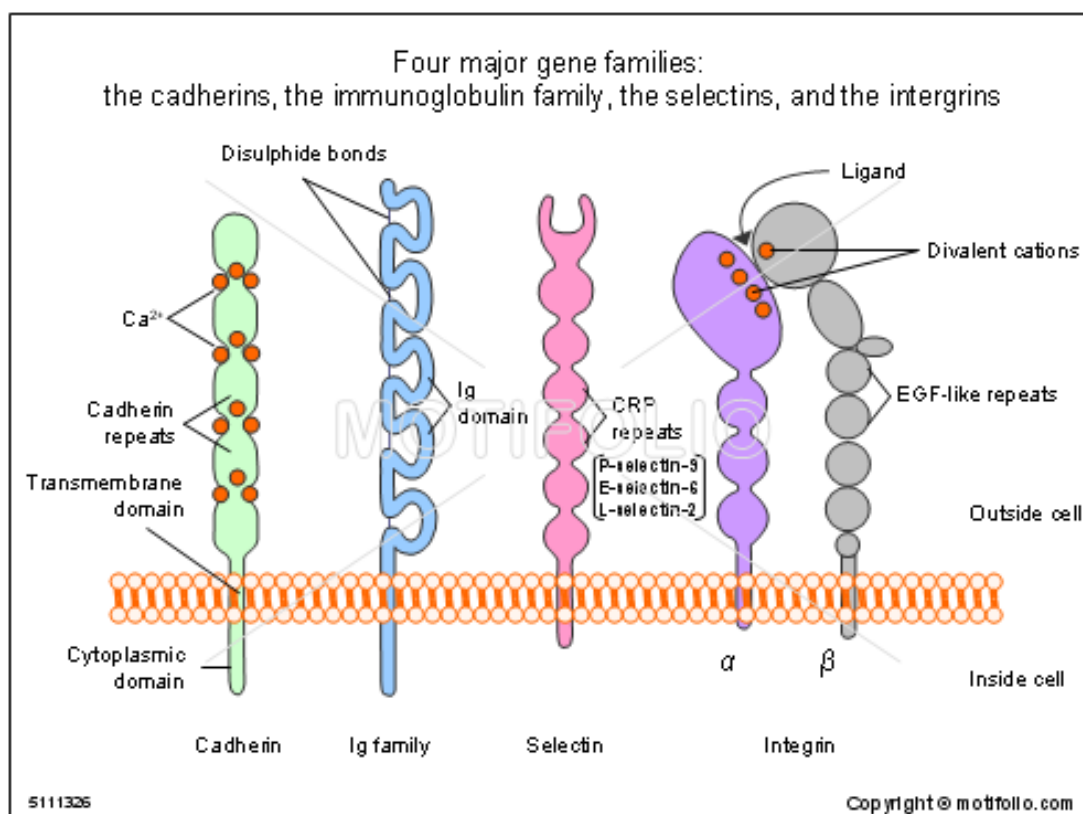
Imunoglobulinové adhezní molekuly mají extracelulární doménu stabilizovanou pomocí disulfidických můstků.

Selektiny disponují na konci extracelulární domény EGF-like doménou (epidermal growth factor, epidermální růstový faktor), na niž navazuje lektinová doména.

Struktura α a β integrinů se od sebe v extracelulární části výrazně liší, každý z nich má tuto část tvořenou jinými doménami. Na konci extracelulární domény jsou přítomny dvojmocné kationty.

Four major gene families the cadherins the immunoglobulin family the selectins and the integrins. *Motifolio: Biomedical PowerPoint Toolkits for Presentations* [online]. [cit. 2017-02-03]. Dostupný na:

<http://www.motifolio.com/5111326.html>



6.2.1 Selektiny

Skupinu selektinů tvoří tři zástupci – L-selektin, P-selektin a E-selektin.

L-selektin je exprimován na povrchu cirkulujících leukocytů, P-selektin a E-selektin nalezneme na povrchu endotelových buněk. Selektiny hrají významnou roli při tzv. rolování – kutálení leukocytu po povrchu endotelu, viz Obrázek 10. Rolování leukocytu po povrchu endotelu je dáno přechodnými interakcemi mezi jednotlivými typy selektinů³⁰.

Fakt, že zajišťují rolování leukocytů s jejich následným prostupem skrz endotel, vedl k předpokladu, že selektiny působí prozánětlivě, čímž podporují rozvoj aterosklerózy. Tento předpoklad byl potvrzen při studii provedené na ApoE-deficientních myších (více viz kapitola 6.1) s deficiencí P-selektinu či E-selektinu. Myši byly krmeny běžnou stravou s obsahem 6 % tuku a 0,0275 % cholesterolu do 20. týdne věku. Následné hodnocení ukázalo, že oproti standardním ApoE-deficientním myším došlo k poklesu výskytu aterosklerotických lézí o 45 % v případě P-selektin deficientních myší a o 24 % v případě E-selektin deficientních myší³¹.

6.2.2 Integriny

Jako integriny označujeme skupinu membránových receptorů. Jsou složeny ze dvou řetězců – α a β . Jejich vazebné místo směřuje ven z buňky, kde na sebe váže glykoproteiny, např. kolagen. Do skupiny β_1 integrinů řadíme tzv. very late antigen (VLA) integriny, ty na sebe váží složky mezibuněčné hmoty, typicky kolagen. β_2 integriny, které nazýváme též leukocytární integriny, zahrnují například LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen-1), jenž je zodpovědný za vazbu s ICAM-1. Nedostatečná exprese β_2 integrinů může vést k rozvoji LAD (Leukocyte adhesion deficiency). Nízká produkce β_2 integrinů je v tomto případě podmíněna geneticky a dosahuje jen 0-5 % běžné produkce. β_3 integriny v organismu nalézají využití při aktivaci trombocytů^{30,32}.

6.2.3 Kadheriny

Kadheriny jsou transmembránové proteiny, jejichž adhezní schopnost je podmíněna přítomností vápenatých iontů. Téměř vždy působí homotypické interakce mezi buňkami. Hlavním kadherinem je E-kadherin (epitelový kadherin), jenž je nezbytný pro správný embryonální vývoj; mutace v genu pro E-kadherin mohou vést k usmrcení plodu. Dalším významným kadherinem je VE-kadherin (vezikulární endotelový kadherin). Nacházíme jej v oblasti mezibuněčných spojů v místě zvaném zonula adherens. Je nezbytný pro normální vaskulogenezi a angiogenezi³³.

6.2.4 Imunoglobulinový typ

Do rodiny imunoglobulinových adhezních molekul řadíme celou řadu proteinů. Z hlediska endotelové dysfunkce jsou pro nás zajímavé především vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) a platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1). ICAM-1 i VCAM-1 se váží s integriny. PECAM-1 nalezneme na většině leukocytů, krevních destiček a endotelových buněk krevního řečiště. Hraje důležitou roli v procesech angiogeneze či krevního srážení^{34,35}.

6.2.4.1 VCAM-1

VCAM-1 nalezneme především na povrchu buněk endotelu, ale může být exprimována též jinými buňkami – makrofágy, myoblasty či dendritickými buňkami. Vazba s integrinem VLA-4 vede ke spuštění kaskády, jež vede k aktivaci endotelových buněk a k migraci leukocytů. K produkci VCAM-1 dochází pravděpodobně v reakci na kumulaci cholesterolu (zejména oxidovaného LDL) v tunica intima^{30,36}.

VCAM-1 exprese byla pozorována v endotelových buňkách tunica intima, povětšinou ve spojení s prozánětlivými látkami. V aterosklerotických plátech se vyskytovala primárně v makrofázích, v buňkách hladké svaloviny cév a v endotelových buňkách ve spodní části plátu. Krom toho bylo možné ji nalézt i v jiných cévách se ztlustěním intimy. Hodnoceny byly vzorky získané u lidí (při pitvách nebo od příjemců transplantátů)³⁷.

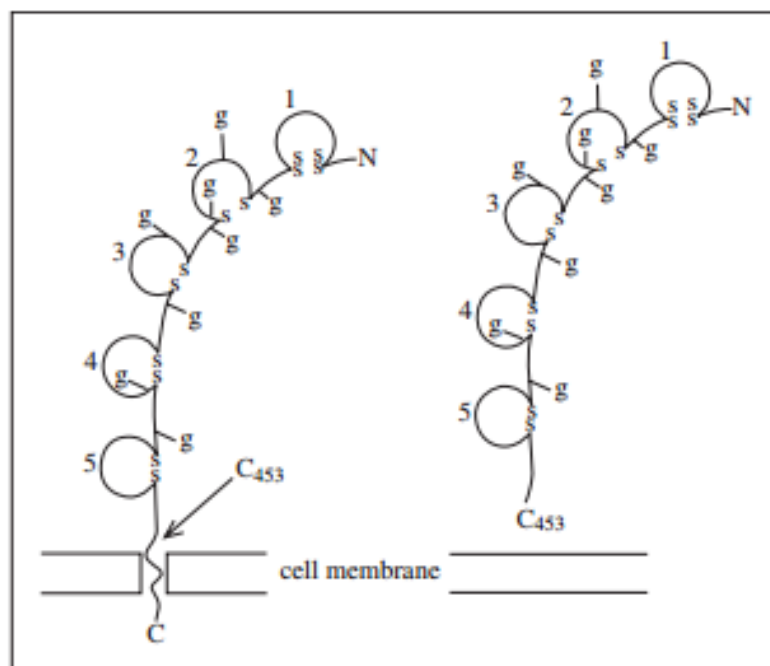
6.2.4.2 ICAM-1

ICAM-1, též CD54, je transmembránový protein, jenž se nachází na povrchu buněk, především endotelových a leukocytárních. ICAM-1 se váže s β_2 integriny. Platí, že jedna molekula může vázat vícero ligandů díky přítomnosti různých vazebných domén. Vytvoření pevné vazby s β_2 integriny vede ke zvýšení adheze leukocytů k endotelu. Expresi ICAM-1 zvyšuje přítomnost nativní i oxidované formy LDL^{30,36}.

V krevní plazmě nalézáme solubilní formu ICAM-1 (sICAM-1), jejíž koncentrace se v plazmě zdravých jedinců pohybuje v rozmezí 100-450 ng/ml, přičemž platí, že hodnoty sICAM-1 jsou zvýšené u pacientů s kardiovaskulárními chorobami, autoimunitním onemocněním či rakovinou. Oproti molekule ICAM-1 postrádá sICAM-1 transmembránovou a cytoplazmatickou doménu, viz Obrázek 9³⁸.

Byla provedena studie na pacientech s koronárním onemocněním srdce (CHD, coronary heart disease). Pro potřeby dané studie bylo CHD definováno jako prodělaný infarkt myokardu (v době starší než 6 měsíců před zařazením do studie, ale ne starší než 5 let) nebo diagnostikovaná angina pectoris. V rámci studie byly porovnávány hodnoty sICAM-1 v séru pacientů s rozvinutým koronárním onemocněním a věkově a pohlavím odpovídajících jedinců bez postižení kardiovaskulárního systému v rámci kontrolní skupiny. Výsledky ukázaly, že zvýšení sICAM-1 o 100 ng/ml zvyšuje riziko vzniku koronárních příhod průměrně o 27 %³⁹.

Obrázek 9: Rozdíl ve struktuře molekuly ICAM-1 a sICAM-1⁴⁰: Vlevo je znázorněna molekula ICAM-1, která disponuje pěti imunoglobulinovými doménami, které jsou stabilizovány disulfidickými můstky, transmembránovou a cytoplazmatickou doménou. Molekula sICAM-1, znázorněná vpravo, naproti tomu postrádá transmembránovou a cytoplazmatickou doménu. Písmeno „g“ v obrázku udává potenciální místa glykosylace molekul.



ICAM-1 i VCAM-1 jsou dobrými markery endotelové dysfunkce, nalézáme je v místech, kde se rozvíjí dysfunkce endotelu s následným možným rozvojem aterosklerózy. V případě aterosklerotických lézí menšího rozsahu a v počátečním stádiu je exprese realizována především endotelovými buňkami. V pokročilém stádiu se exprese účastní všechny buňky v tunica intima, v případě VCAM-1 se mohou účastnit též buňky tunica media, což je dáno pravděpodobně migrací buněk ze střední do vnitřní vrstvy cévní stěny.

Dřívější studie uváděly, že absence ICAM-1 nemá vliv na formování aterosklerotických lézí³⁷. Studie u ApoE-deficientních myší (více viz kapitola 6.1) se sníženou produkcí ICAM-1, které byly krmeny běžnou stravou s obsahem 6 % tuku a 0,0275 % cholesterolu, však prokázala, že deficit ICAM-1 vede ke snížení výskytu lézí o 30 %³¹.

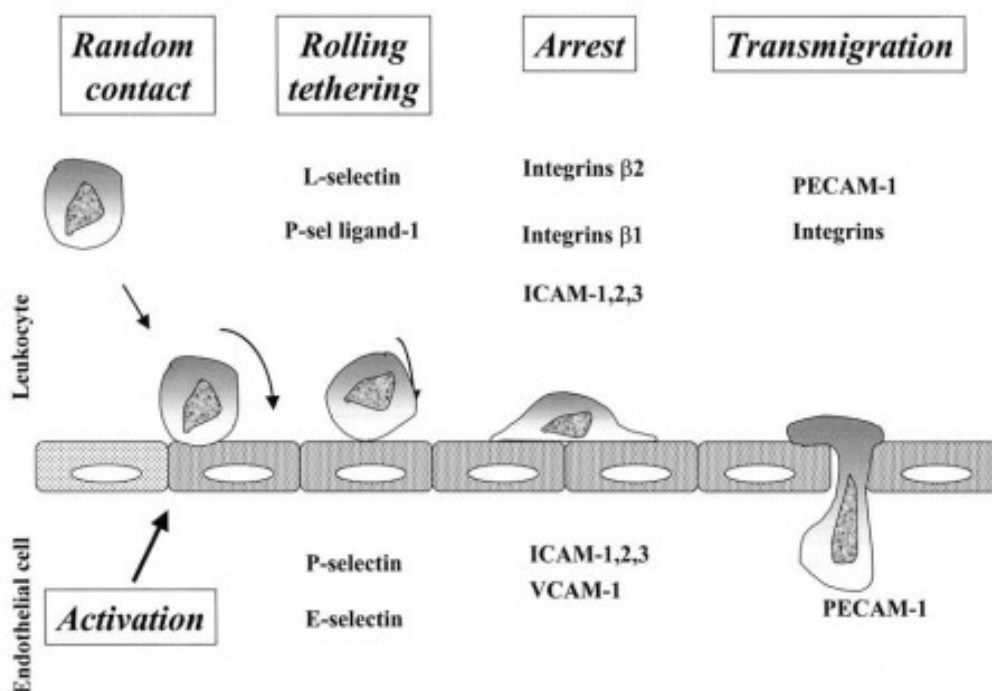
U lidí byla ICAM-1 pozorována především v endotelových buňkách umístěných nad plátem, v makrofázích a buňkách hladké svaloviny v tunica intima³⁷. Na místo

exprese mají vliv i jiné prozánětlivě působící faktory, např. působení tumor nekrotizujícího faktoru α (více viz kapitola 5.3.2) zvyšuje expresi ICAM-1 na endotelových buňkách, mesangiálních buňkách a na povrchu epitelových buněk bronchů. Působení interleukinu-1 (více viz kapitola 5.3.1) má za následek zvýšení exprese ICAM-1 v endotelových buňkách a na fibroblastech. Expresi na fibroblastech vyvolá i působení interferonu γ (více viz kapitola 5.3.3)⁴¹.

ICAM-1 je sice dobrým ukazatelem zánětu a rozvíjející se endotelové dysfunkce, nicméně jeho exprese je přibližně stejná ve všech oblastech postižené cévy bez ohledu na budoucí výskyt lézí^{37,42}.

U normocholesterolemických zvířat byla pozorována vyšší exprese adhezních molekul působením hemodynamických faktorů – např. zvýšením průtoku krve, což může vést i ke zvýšení propustnosti pro lipoproteiny. Zvýšená exprese ICAM-1 a VCAM-1 u jinak zdravých zvířat může vést k občasné migraci leukocytů, které se pak hromadí v místech s predispozicí k tvorbě lézí. Zde jsou leukocyty později aktivovány, dojde-li k hypercholesterolemii a kumulaci LDL³⁷.

Obrázek 10: Působení adhezních molekul³⁶: První kontakt leukocyty s endotelem zajišťují selektiny, jejichž působením se molekula leukocyty kutálí po povrchu. V dalším kroku dochází vlivem působení integrinů a molekul imunoglobulinového typu ke lnutí leukocyty k endotelu a následně k jeho přestupu skrze endotelové buňky za účasti PECAM-1.



6.3 Cytokiny

Cytokiny jsou signální proteiny produkované buňkami imunitního systému. Jejich funkcí je regulace růstu a diferenciací buněk. Jedná se o látky s pleiotropní aktivitou, každý jeden z nich má schopnost ovlivnit různé typy buněk. Vykazují synergický efekt, spojením dvou cytokinů dojde k zesílení jejich aktivity. Jejich působení může být autokrinní, tedy pouze na buňky, jež je produkují, parakrinní, tedy na buňky v blízkém okolí, ale i endokrinní čili na buňky ve větší vzdálenosti⁴³.

6.3.1 Interleukiny

Interleukiny (IL) jsou signální molekuly, které zajišťují komunikaci mezi buňkami imunitního systému. Jsou produkovány nejen leukocyty, ale též epitelovými buňkami. Dle jejich působení je můžeme rozdělit do dvou skupin – prozánětlivé a protizánětlivé. Mezi prozánětlivé IL patří IL-1 či IL-2, jež působí jako růstové faktory. Často pracují ve spojení s jinými cytokiny, typicky s tumor nekrotizujícími faktory. Nejvýznamnějším protizánětlivě působícím interleukinem je IL-10, jenž tlumí produkci IL-1 a IL-2^{43,44}.

6.3.2 Tumor nekrotizující faktory

Skupina tumor nekrotizujících faktorů (TNF) zahrnuje řadu cytokinů, z nichž největší význam pro nás mají TNF- α a TNF- β . Oba hrají významnou roli v rozvoji zánětlivé reakce. Krom toho podporují také působení oxidačního stresu a snižují dostupnost NO. Zapřičiňují i zvýšení exprese tkáňového faktoru, čímž působí protromboticky^{45,46}.

6.3.3 Interferony

Interferony (IFN) mají výrazné antivirové účinky. IFN skupiny I (IFN α , IFN β) mají účinky protizánětlivé, využívají se nejen v terapii virových infekcí, ale též v terapii některých autoimunitních onemocnění, např. roztroušené sklerózy. Naproti tomu IFN γ , zástupce IFN skupiny II, má účinky prozánětlivé. Produkce IFN γ může být zvýšena

přítomností některých dalších cytokinů, např. IL-12. IFN γ se spolu s TNF β podílí na expresi ICAM-1, čímž působí proaterogenně^{47,48}.

6.4 C-reaktivní protein

C-reaktivní protein (CRP) je ukazatelem zánětu. Jedná se ovšem o ukazatel nespecifický, jeho hodnoty v krvi rostou se zánětem bez ohledu na jeho lokaci či závažnost. Syntézu CRP indukují především IL-1 a IL-6⁴⁹.

Zvýšená hladina CRP má za následek sníženou činnost eNOS vlivem nižší dostupnosti BH₄ a naopak zvýšení hladiny ET-1. Převažuje tedy vazokonstrikční působení. Dále byl prokázán vliv CRP na expresi adhezních molekul ICAM-1, VCAM-1 a E-selektinu^{50,51}.

6.5 Cholesterylester transfer protein

Významnou roli v aterogenezi hraje i cholesterylester transfer protein (CETP). Jedná se o protein, jenž zajišťuje přenos cholesterylesteru z HDL na LDL, VLDL a chylomikrony. Ze zmíněných lipoproteinů o nízké hustotě pak přesouvá triacylglyceroly na HDL. Syntéza CETP probíhá v játrech a je regulována typem potravy – při podávání vysokotukové potravy se syntéza zvyšuje. Myši nevykazují žádnou plazmatickou aktivitu CETP, je tedy nutné je pro výzkum geneticky modifikovat⁵².

Výše popsaným působením CETP snižuje hladiny HDL a působí tak proaterogenně. Na druhou stranu se CETP účastní i zpětného transportu cholesterolu z periferie do jater, čímž může působit protiaterogenně. Konkrétní působení tedy závisí na okolních faktorech⁵³. Například u myší krmených vysokocholesterolovou dietou s obsahem kyseliny cholové vedl CETP k poklesu hladin HDL, a naopak ke zvýšení hladin LDL a VLDL, což mělo za následek progresi aterosklerózy. Naproti tomu u myší, u nichž byla genetickou modifikací navozena hypertriglyceridémie, vedlo působení CETP ke snížení aterogeneze⁵⁴.

7 Zvířecí modely

Rostoucí prevalence kardiovaskulárních onemocnění vedla k potřebě zkoumání těchto chorob, jejich příčin, faktorů, jež mají na jejich rozvoj vliv, a možností léčby. K tomuto účelu jsou využívána různá experimentální zvířata. Dříve byla využívána především větší zvířata – králík, prase či opice, do vhodného modelu však měla daleko. Krysy a psi například netvoří spontánní léze. Králíci též nemají dispozice k tvorbě aterosklerotických lézí, nicméně podávání cholesterolové diety velmi rychle vede k aterogenezi. Opice a prasata sice vykazují reprodukovatelné výsledky, ale jejich chov je finančně i časově náročný. Z těchto důvodů se využívá nejvíce myši⁵⁵. Chov myši není finančně ani prostorově nikterak náročný, doba březosti samic činí pouhé 3 týdny a jedinci se sami stávají reprodukčně vyvinutými již v 6 týdnech života.

Brzy po zahájení prvních výzkumů se zjistilo, že myši jsou vůči ateroskleróze značně rezistentní, při běžné stravě je hladina cholesterolu v jejich krvi nízká (pod 2,5 mmol/l), navíc se u nich cholesterol vyskytuje převážně ve formě HDL, který působí proti rozvoji aterosklerózy. Výjimkou se ukázal být kmen C57BL/6J. Vyšší náchylnost pro aterogenezi vykazují samice. Z genetických úprav je využíváno především vyřazení genu pro apolipoprotein E (ApoE) či genu pro LDL-receptor^{54,56,57}.

Myši nám tak mohou posloužit jako dobrý zdroj pro modelové situace rozvoje aterosklerózy a jejího ovlivnění, nicméně je třeba nezapomínat, že i přes značnou podobnost jsou mezi myším a lidským modelem aterosklerózy stále určité rozdíly, např. u myši nedochází většinou k ruptuře aterosklerotického plátu⁵⁸.

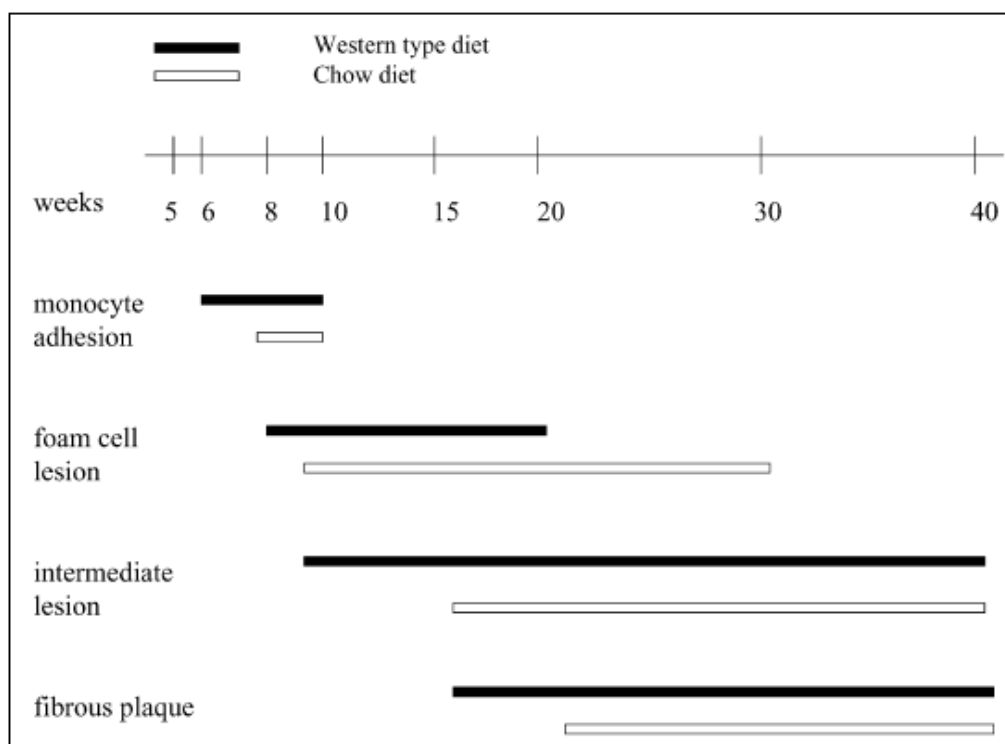
7.1 ApoE-deficientní myši

ApoE je protein, jenž je umístěn na povrchu lipoproteinů (s výjimkou LDL) a jehož úkolem je vazba lipoproteinů k příslušným receptorům. Je produkován nejen játry, ale též makrofágy, které jej secernují jako ochranu před kumulací VLDL. Rozlišujeme tři isoformy ApoE – E2, E3, E4 (podle alel na 19. chromozomu – $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ či $\epsilon 4$), liší se v aminokyselinách v pozicích 112 a 158 - E2 zde má navázán cystein, E4 arginin a E3 má v pozici 112 navázán cystein a v pozici 158 arginin. Bylo prokázáno, že jednotlivé skupiny populace mají různé zastoupení isoform ApoE. Obecně je možno říci, že vyšší zastoupení E2 a E4 vede k častějšímu rozvoji poruch metabolismu lipidového spektra. V případě E2 dochází k rozvoji hyperlipoproteinémie typu III, dochází

k neúplnému odstraňování zbytků chylomikronů a VLDL, následkem je hypertriglyceridémie. Je to dáno výrazně nižší afinitou k receptorům v játrech (má pouze 2% vazebnou schopnost oproti isoformám E3 a E4). Isoforma E4 působí konverzi VLDL na LDL, což má za následek rozvoj hypercholesterolémie. Nejčastěji zastoupenou formou v populaci je však ApoE-3, jenž působí vazbu lipoproteinů k receptorům, a tedy jejich odbourávání z krve, pro experimentální modely aterogeneze se proto využívá vyřazení genu pro ApoE^{59,60}.

I při běžné stravě se hladiny cholesterolu u ApoE-deficientních myši pohybují v rozmezí 10-13 mmol/l vlivem kumulace VLDL (very low-density lipoprotein) a chylomikronů, jež na sobě mají navázaný volný cholesterol. Při podávání Western-type diet, která obsahuje 0,15 % cholesterolu a 21 % tuku, se hladiny cholesterolu zvedly až čtyřnásobně a významně vzrostla velikost lézí a rychlost jejich progresu, viz Obrázek 11. Již po pěti týdnech dochází ke kumulaci monocytů a jejich migraci do cévní stěny, po 10 týdnech můžeme pozorovat tukové proužky, již po 20 týdnech jsou pak patrné fibromuskulární pláty^{54,61}.

Obrázek 11: Srovnání dvou typů stravy u ApoE-deficientních myší⁵⁵: Myši krmené běžnou stravou (Chow diet) vykazují stejný rozvoj aterosklerózy jako myši krmené Western type diet, jen je u nich rozvoj pomalejší.



7.2 LDLr-deficientní myši

U LDLr-deficientních myší je odstraněn gen pro LDL-receptory, vychytání LDL v játrech je tudíž sníženo, což vede k vysoké koncentraci LDL v krvi. Nicméně při podávání běžné stravy s obsahem 4-6 % tuku a méně než 0,02 % cholesterolu jsou projevy pouze minimální a hladiny cholesterolu se pohybují v rozmezí 5-7 mmol/l⁵⁸. Jedná se však o model, jenž je velmi citlivý na podávanou dietu. Při krmení Paigenovou dietou, která obsahuje 1,25 % cholesterolu, 15 % tuků a 0,5 % kyseliny cholové, se hladina cholesterolu zvyšuje až na přibližně 38 mmol/l⁵⁵.

7.3 ApoE/LDLr dvojité deficientní myši

Jako model velmi vhodný pro pozorování rozvoje aterosklerózy se prokázal model ApoE/LDLr dvojité deficientních myší, u nichž je vyřazen jak gen pro ApoE, tak i gen pro LDL-receptory. Tento typ geneticky modifikovaných myší nám umožňuje sledovat rozvoj aterosklerózy a její vliv na cévní endotel bez nutnosti podávání vysokotukové diety⁵⁵.

7.4 Koncept 3R

Bez ohledu na vybrané zvíře je zapotřebí dodržovat podmínky 3R, které poprvé stanovili Russel a Bruch v roce 1959.

Replacement, náhrada, znamená, že bychom se měli primárně soustředit na jiné zdroje a postupy výzkumu, je-li to možné. Lze-li místo zvířat využít například metody probíhající in vitro, matematické nebo počítačové modelování či vývojově nižší organismy, pak je na místě těchto možností využít.

Reduction, snížení počtu, znamená, že by měl být k výzkumu užít vždy jen nejmenší počet zvířat nutný k získání validních výsledků. Toho lze dosáhnout například zapojením vhodných statistických a analytických metod.

Refinement, zdokonalení, je míněno ve smyslu vylepšení metod užitých ve výzkumu tak, aby utrpení zvířete bylo co nejmenší. Utrpením není myšlena pouze fyzická bolest, ale též vystavení stresu⁶².

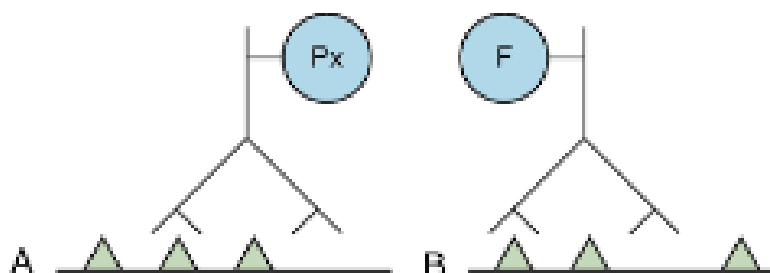
8 Imunohistochemie

Imunohistochemie je metoda umožňující detekci konkrétních antigenů (Ag) na základě vazby antigen-protilátka. Dělí se na metodu přímou a nepřímou.

8.1 Přímá metoda

Přímá metoda, viz Obrázek 12, je založena na značení primární protilátky (fluoresceinem, kovy či enzymaticky). Výhodou je především rychlost. Tato metoda je využitelná při vysokých koncentracích Ag.

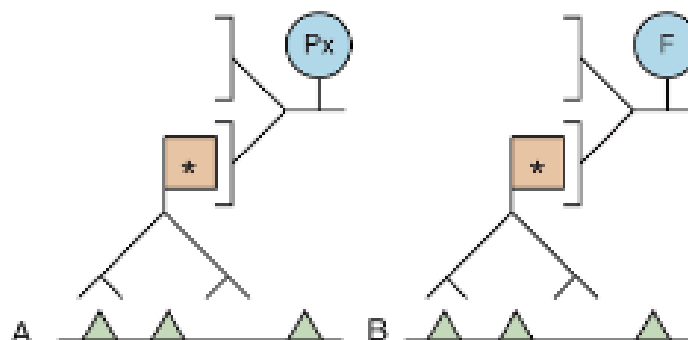
Obrázek 12: Přímá imunohistochemie – A: protilátka značená enzymaticky – peroxidázou, B: protilátka značená fluoresceinem⁶³.



8.2 Nepřímá dvoustupňová metoda

Nepřímá metoda využívá navíc sekundární protilátku. Můžeme ji dále rozdělit na nepřímou metodu dvoustupňovou a trojstupňovou. Při dvoustupňové metodě se primární, neznačená protilátka naváže na zkoumaný Ag. Sekundární, značená protilátka se naváže na primární protilátku, viz Obrázek 13. Tato metoda je sice komplikovanější, při správném provedení je ale citlivější než metoda přímá^{63,64}.

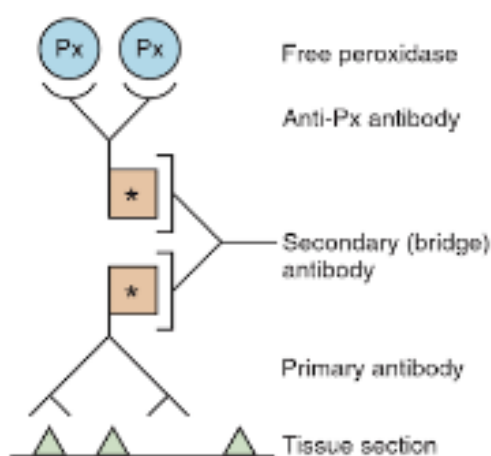
Obrázek 13: Nepřímá dvoustupňová imunohistochemie – A: sekundární protilátka značena peroxidázou, B: sekundární protilátka značena fluoresceinem⁶³.



8.3 Nepřímá trojstupňová metoda

Trojstupňová metoda se využívá při velmi nízké koncentraci Ag. Nejprve dojde k navázání primární, neznačené protilátky na Ag, dále je aplikována sekundární, též neznačená protilátka, která tvoří můstek, a nakonec je aplikován značený komplex, viz Obrázek 14⁶³. Je nutné aplikovat sekundární protilátku v dostatečném množství, v opačném případě dojde k vazbě na obou jejích koncích a výsledek bude falešně negativní⁶⁴.

Obrázek 14: Nepřímá trojstupňová imunohistochemie, jako značený komplex je využit peroxidáza-anti-peroxidázový komplex⁶³.



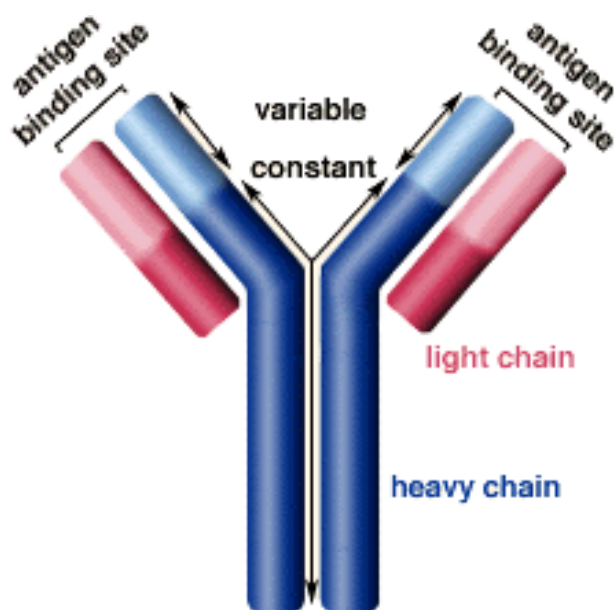
8.4 Protilátky v imunohistochemii

Protilátky (imunoglobuliny, Ig) jsou proteiny, jež jsou schopné v organismu vyhledávat a vázat specifické molekuly, antigeny. Jsou produkovány specifickými B-lymfocyty, plazmatickými buňkami. Molekula Ig se skládá ze dvou shodných lehkých a dvou shodných těžkých řetězců, které jsou vzájemně spojeny pomocí disulfidických můstků, má tvar Y, viz Obrázek 15. Každá molekula Ig má svou konstantní a variabilní část, ve variabilní oblasti se od sebe jednotlivé molekuly odlišují; právě tato část je zodpovědná za vazbu s příslušným Ag.

Obrázek 15: Struktura molekuly imunoglobulinu: Modře je znázorněn těžký řetězec, růžově lehký řetězec. Světlá část je variabilní, v této části dochází k vazbě antigenu.

Antibody structure. *The Biology Project* [online]. [cit. 2017-01-23]. Dostupný na:

<http://www.biology.arizona.edu/immunology/tutorials/antibody/structure.html>

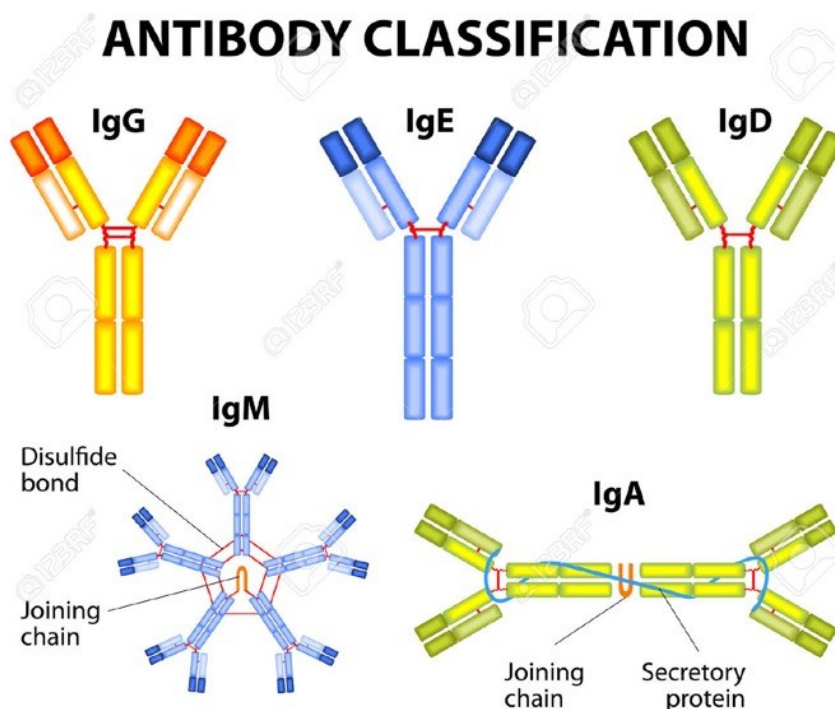


Dle typu těžkého řetězce rozlišujeme 5 druhů Ig – IgD, IgE, IgG, jejichž struktura je monomerní, IgA, vyskytující se ve formě dimeru, a IgM, jenž tvoří pentamer, viz Obrázek 16⁶⁵.

Obrázek 16: Struktura jednotlivých typů imunoglobulinu: Struktura IgG, IgE a IgD je monomerní, IgA tvoří dimer a IgM pentamer.

Antibody classification. 123RF [online]. [cit. 2017-01-23]. Dostupný na:

https://www.123rf.com/photo_27277653_different-types-of-immunoglobulins-igg-iga-igd-ige-and-igm.html



8.4.1 Monoklonální protilátky

Monoklonální protilátky (MAb) jsou získávány z jednoho klonu B-lymfocytů, všechny MAb vzniklé z jedné produkce mají tedy zcela shodnou strukturu. Jsou schopny se vázat pouze s jedním epitopem (vazebným místem Ag). Produkce MAb je finančně i technicky náročná. Omezená specifita MAb je jejich výhodou i nevýhodou. Na jednu stranu nám umožňují získat reprodukovatelné výsledky a rozeznat Ag i ve směsi strukturně podobných molekul, na druhou stranu je jejich využití omezeno vždy jen na jeden konkrétní Ag, navíc nedokáží pojmout i případné drobné změny ve struktuře Ag^{65,66}.

8.4.2 Polyklonální protilátky

Polyklonální protilátky (PAb) jsou produktem mnoha klonů B-lymfocytů. Tím získáme směs PAb, v níž se jednotlivé molekuly mohou lehce odlišovat. PAb jsou schopny vázat více epitopů na jednom Ag, čímž umožňují zesílit sledovaný signál. Dalšími výhodami jsou nízká finanční i technická nákladnost a tolerance k drobným odlišnostem ve struktuře téhož Ag. To však může být i nevýhodou, vzniká větší šum pozadí^{65,66}.

9 Zadání – cíl práce

Cílem práce bylo sledovat změny v expresi eNOS a ICAM-1 v aortě myši kmene C57BL/6J po podávání vysokotukové diety s obsahem 1,25 % cholesterolu a 40 % tuku v porovnání s kontrolní skupinou myší, jež byla krmena standardní stravou, pomocí imunohistochemických metod.

10 Experimentální část práce

10.1 Použitá zvířata a příprava vzorků

Pro účely tohoto experimentu byly použity dvouměsíční samice myši kmene C57BL/6J (Velaz s.r.o., Česká republika). Celkem 12 myši bylo náhodně rozděleno do dvou skupin po 6 jedincích, přičemž jedna skupina byla po dobu 3 měsíců krmena standardní stravou, druhá skupina byla po stejnou dobu krmena vysokotukovou stravou s obsahem 1,25 % cholesterolu a 40 % tuku (Research Diets, Inc., N.J., USA). Konzumace stravy byla denně monitorována, ve spotřebě nebyly zaznamenány žádné rozdíly – jak mezi jednotlivými myšmi, tak ani mezi oběma skupinami. Na konci experimentu byly myši ponechány přes noc bez přístupu ke stravě, aby vyhladověly, a následně byly podrobeny eutanázii.

Aorty s horní polovinou srdce byly vyjmuty a uchovávány v tekutém dusíku při teplotě -80 °C. Vzorky byly poté nakrájeny na řezy o tloušťce 7 µm. Pro samotnou práci byly použity preparáty získané ze 4 myši krmených standardní stravou a ze 4 myši krmených vysokotukovou dietou, vždy 6 sklíček, přičemž na každém sklíčku byly dva řezy. Celkem tedy bylo zpracováno 48 sklíček pro stanovení eNOS a 48 sklíček pro stanovení ICAM-1.

V průběhu celé studie bylo postupováno v souladu se zákonem 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týraní v aktuálně platném znění, všechny protokoly byly schváleny Odbornou komisí pro zajišťování dobrých životních podmínek pokusných zvířat na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové.

10.2 Imunohistochemie

Pro detekci eNOS a ICAM-1 byla využita metoda ABC (avidin-biotin complex), tedy trojstupňová nepřímá imunohistochemie za použití avidinu a biotinu. Avidin je protein vyskytující se ve vaječném bílku, který má schopnost vázat biotin (vitamin B7, vitamin H). Nejprve se naváže neznačená primární protilátka na Ag, na primární protilátku se napojí protilátka sekundární, jež má na sobě vázaný biotin. Jako značený komplex se využívá komplex avidin-peroxidáza. Avidin má 4 vazebná místa, některá jsou

obsazena molekulami peroxidáz, jiná zůstávají volná pro vazbu s biotinem, na níž je metoda založena (57).

10.3 Pracovní postup

Použitá činidla:

PBS (phosphate-buffered saline):

NaCl	80,0
KCl	2,0
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	11,5
(nebo Na ₂ HPO ₄	10,21)
KH ₂ PO ₄	2,0
Aqua bidestilata	ad 1000,0

Takto připravený roztok má pH 6,8. Pro potřeby imunohistochemie se používá zředěný roztok o pH 7,4. Ten získáme naředěním PBS destilovanou vodou v poměru 1:9.

BSA (bovine serum albumin):

5 g BSA se smísí s 95 g ředěného PBS. Po rozlití do zkumavek po 1 ml se uloží do mrazáku.

Primární protilátky:

Pro detekci ICAM-1 byla využita protilátka hamster anti-mouse (BD Biosciences Pharmingen) ředěná v BSA v poměru 1:200.

Pro detekci eNOS posloužila protilátka rabbit anti-mouse (SantaCruz) ředěná v BSA v poměru 1:100.

Sekundární protilátky:

Pro detekci ICAM-1 byla na vzorky nanášena protilátka goat anti-hamster (Vector Laboratories) ředěná v BSA v poměru 1:600 s přidavkem 12 μ l 2% myšího séra.

Pro detekci eNOS byla využita protilátka goat anti-rabbit (Vector Laboratories) ředěná v BSA v poměr 1:400 s přidavkem 8 μ l 2% myšího séra.

10.3.1 Stanovení myší ICAM-1, ABC metoda

1. Preparáty byly ponořeny do acetonu na 30 minut při teplotě -20 °C, poté 10 minut na vzduchu osychaly.
2. Speciálním olejovým fixem byl vymezen okruh kolem jednotlivých preparátů tak, aby se použitá činidla udržovala pouze v oblasti umístění preparátů.
3. Následovalo ponoření vzorků na 5 minut do PBS.
4. V dalším kroku byl na vzorky aplikován roztok mléka na 30 minut. Roztok byl připraven rozpuštěním 0,5 g sušeného mléka v 10 ml PBS. Mléko slouží k nasycení tkáně bílkoviny, čímž zabráníme nespecifickému vychytávání aplikovaných protilátek. Následoval oplach v PBS.
5. Zkoumaná tkáň může obsahovat endogenní avidin či biotin, vzorek byl proto podroben inkubaci s anti-avidinem po dobu 15 minut.
6. Dále byly vzorky vloženy do roztoku PBS na 2×5 minut, poté proběhla inkubace s anti-biotinem opět na 15 minut a oplach v PBS.
7. Poté byla na 60 minut nanesena primární protilátka (hamster anti-mouse) ředěná v BSA v poměru 1:200.
8. Sklíčka byla ponořena v PBS na 2×5 minut
9. V dalším kroku byla aplikována sekundární protilátka (goat anti-hamster) ředěná v BSA v poměru 1:600 a dále bylo přidáno 12 μ l 2% myšího séra.
10. Oplach v PBS byl tentokrát pouze 5minutový.
11. Aby bylo zablokováno působení peroxidázy přítomné přirozeně ve tkáni, vzorky byly ponořeny do roztoku 3% peroxidu vodíku. Ten byl připraven smísením 8 ml 30% peroxidu a 70 ml PBS. V takto připraveném roztoku setrvaly vzorky 15 minut.
12. V dalším kroku došlo opět k oplachu PBS na 2×5 minut.

13. Následovala aplikace ABC komplexu. Ten byl připraven smísením 5 μ l činidla A, 5 μ l činidla B a 250 μ l PBS. Tento roztok bylo zapotřebí připravit 30 minut předem.
14. Sklíčka byla na 2 \times 5 minut ponořena do PBS.
15. Na 5 vteřin byl aplikován roztok DAB, ten byl připraven smísením 10 μ l DAB a 500 μ l pufru. Komplex ABC je značen peroxidázou, která oxidaže DAB za vzniku stabilního hnědého produktu.
16. Po oplachu v PBS byly vzorky vloženy do destilované vody a následně na 5 vteřin do roztoku hematoxylinu, který zbarví buněčná jádra modře.
17. Poté setrvaly vzorky 1 minutu pod tekoucí vodou.
18. Po opláchnutí vzorků v acetonu byly postupně vloženy na 3 minuty do roztoku aceton-xylen 10:1 a na stejnou dobu do roztoku aceton-xylen 1:10.
19. Následovalo ponoření do xylen na 3 \times 2 minuty. Pomocí kroků 19 a 20 byly vzorky odvodněny a pročištěny.
20. Pomocí montovacího media Eukit byly vzorky překryty krycím sklíčkem.
21. Vyhodnocení probíhalo pomocí digitální kamery ProgRes CT3 (Jenoptik, Německo) a softwaru NIS-elements (Laboratory Imaging, Česká republika).

10.3.2 Stanovení myší eNOS, ABC metoda

1. Postup práce byl velmi podobný předchozí metodě, vzorky byly opět nejprve ponořeny na 30 minut do acetonu, po oschnutí na vzduchu a označení speciálním fixem byly na 5 minut ponořeny v PBS a poté 30 minut v roztoku mléka.
2. Následovala inkubace s anti-avidinem a ponoření do PBS na 2 \times 5 minut, inkubace s anti-biotinem a oplach v PBS.
3. Dále byly vzorky na 60 minut vystaveny působení primární protilátky (rabbit anti-mouse), která byla předem smísená s BSA v poměru 1:100.
4. Po oplachu v PBS bylo zopakováno 30minutové působení roztoku mléka.
5. V dalším kroku byla na vzorek aplikována sekundární protilátka (goat anti-rabbit), která byla ředěna v BSA v poměru 1:400 s přídavkem 8 μ l 2% myšního séra.
6. Po 5minutovém oplachu v PBS následovalo 15minutové ponoření v roztoku 3% peroxidu vodíku, poté byly vzorky opět na 2 \times 5 minut vloženy do roztoku PBS.

7. Další postup byl již shodný s předchozí metodou, následovala aplikace ABC komplexu a vystavení vzorků DAB, tentokrát však na 10 vteřin. Po oplachu v PBS a vložení do destilované vody proběhlo barvení jader hematoxylinem a následné modření pod tekoucí vodou po dobu 1 minuty.
8. Dále byly vzorky podrobeny oplachu v acetonu, 3minutovému setrvání v roztoku aceton-xylen (10:1), opět 3minutovému působení roztoku aceton-xylen (1:10) a ponoření do roztoku xylenů na 3×2 minuty.
9. Po nanesení eukitu a přiložení krycího sklíčka byly preparáty hodnoceny.

11 Výsledky

Výsledky imunohistochemické detekce eNOS a ICAM-1 jsou znázorněny na obrázcích 17-28. Pozitiva je viditelná jako hnědé zbarvení.

Obrázky 17-19 znázorňují expresi eNOS v kontrolní skupině myší, jež byla krmena standardní stravou. Exprese je v aortě patrná pouze na endotelu. Pozitivita je výrazná a dobře pozorovatelná.

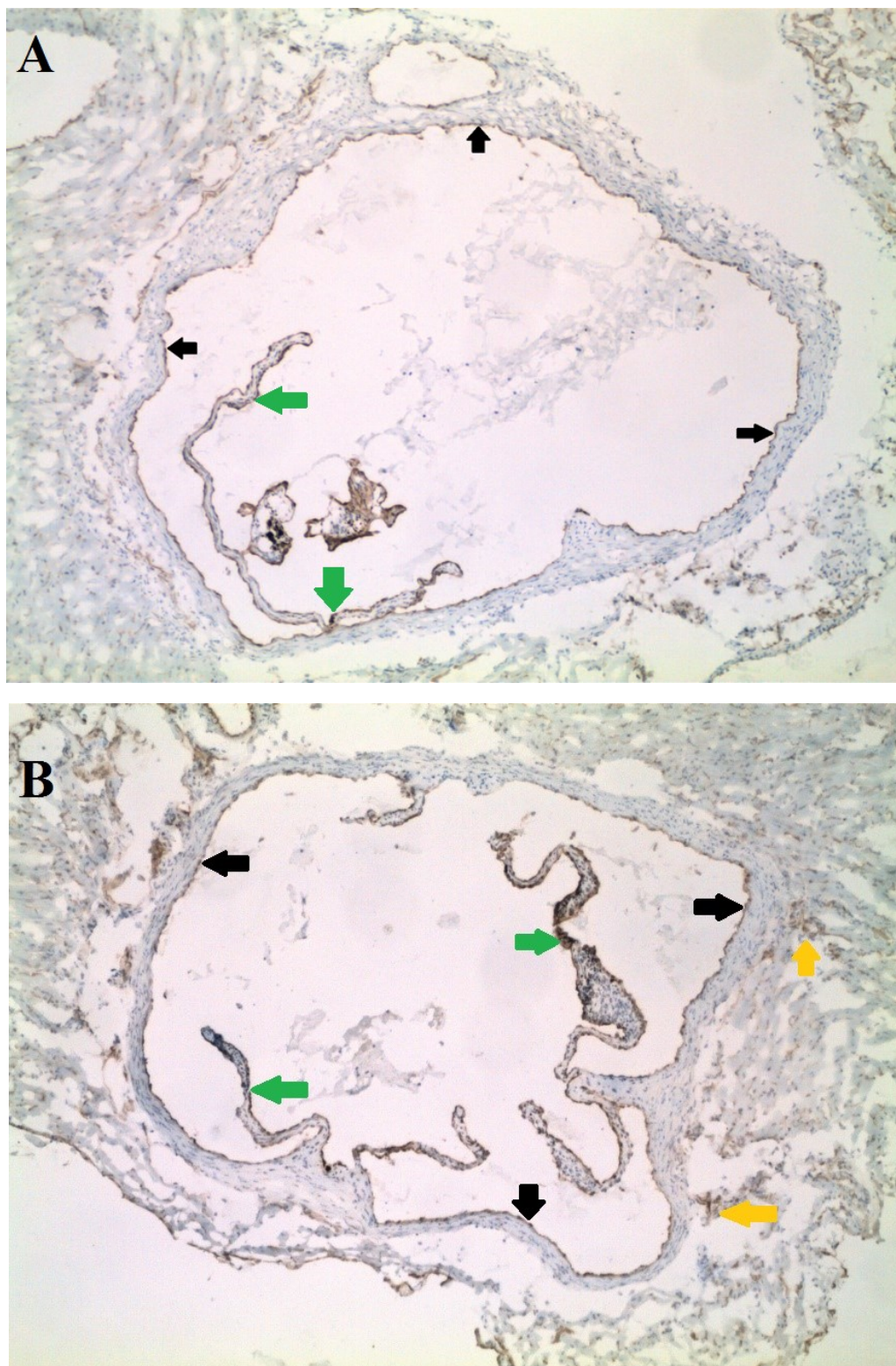
Exprese eNOS v experimentální skupině myší, jež byla krmena vysokotukovou dietou s obsahem 1,25 % cholesterolu a 40 % tuku, je zobrazena na obrázcích 20-22. Oproti kontrolní skupině nebyl pozorován významný rozdíl.

Obrázky 23-25 vyobrazují expresi ICAM-1 v aortě kontrolní skupiny myší. Exprese je opět v rámci aorty pozorovatelná pouze na endotelu, oproti eNOS je ale méně výrazná a pokrývá jen část endotelu aorty.

Obrázky 26-28 zobrazují expresi ICAM-1 v aortě myší, jež byly krmeny vysokotukovou dietou. Exprese se zdá být ve srovnání s kontrolní skupinou velmi podobná, není pozorován signifikantní rozdíl.

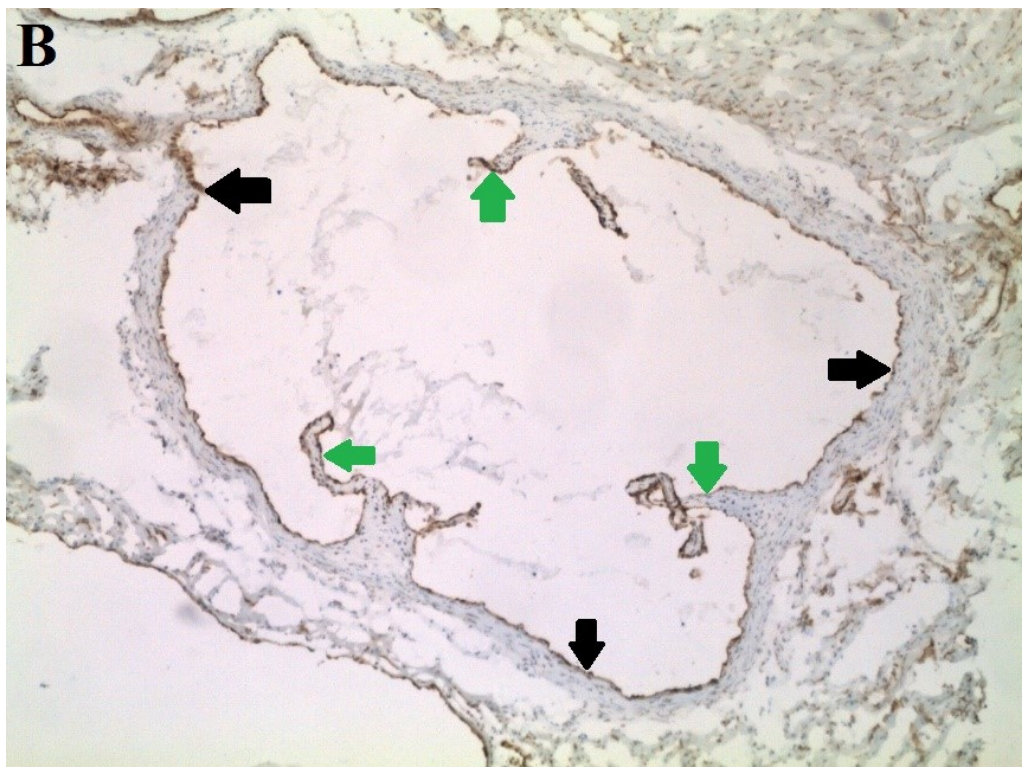
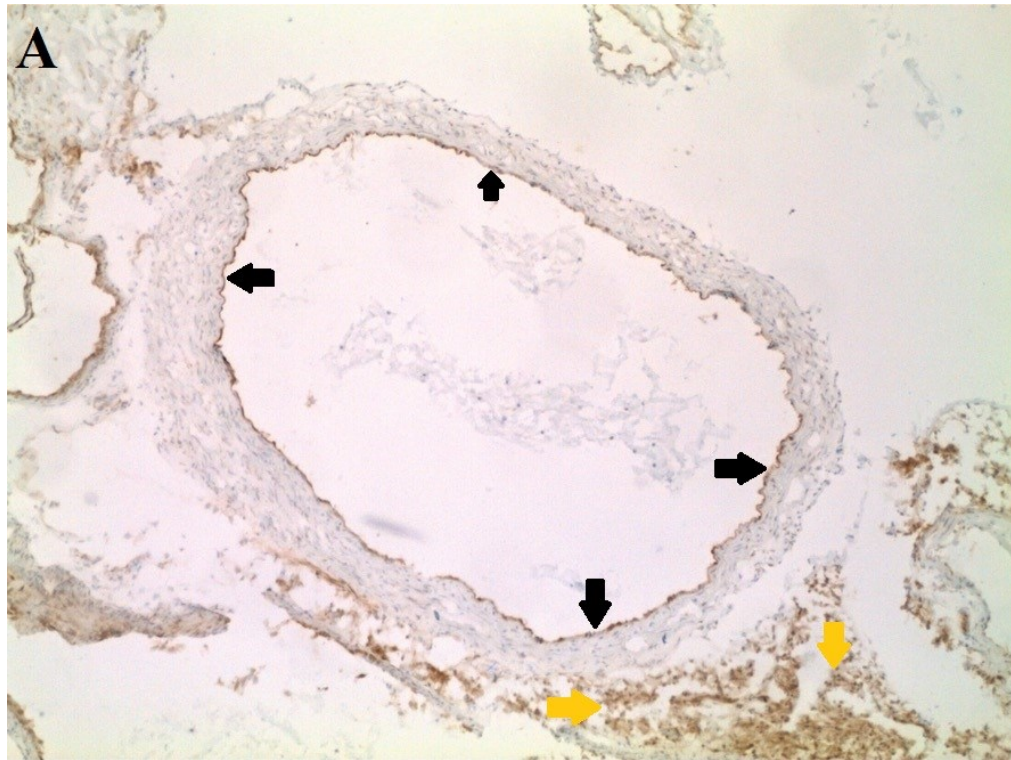
Obrázek 17: Expres eNOS – kontrolní skupina

Na obrázcích 17 A a B je znázorněna exprese eNOS v aortě kontrolní skupiny myši, jež byla krmená standardní stravou. Černými šipkami je označena pozitivní (hnědě zbarvená) reakce na endotelu. Zelené šipky znázorňují zbytky aortálních poloměsíčitých chlopní. Oranžové šipky poukazují na pozitivní reakci v myokardu mimo aortu. Zvětšení 40×.



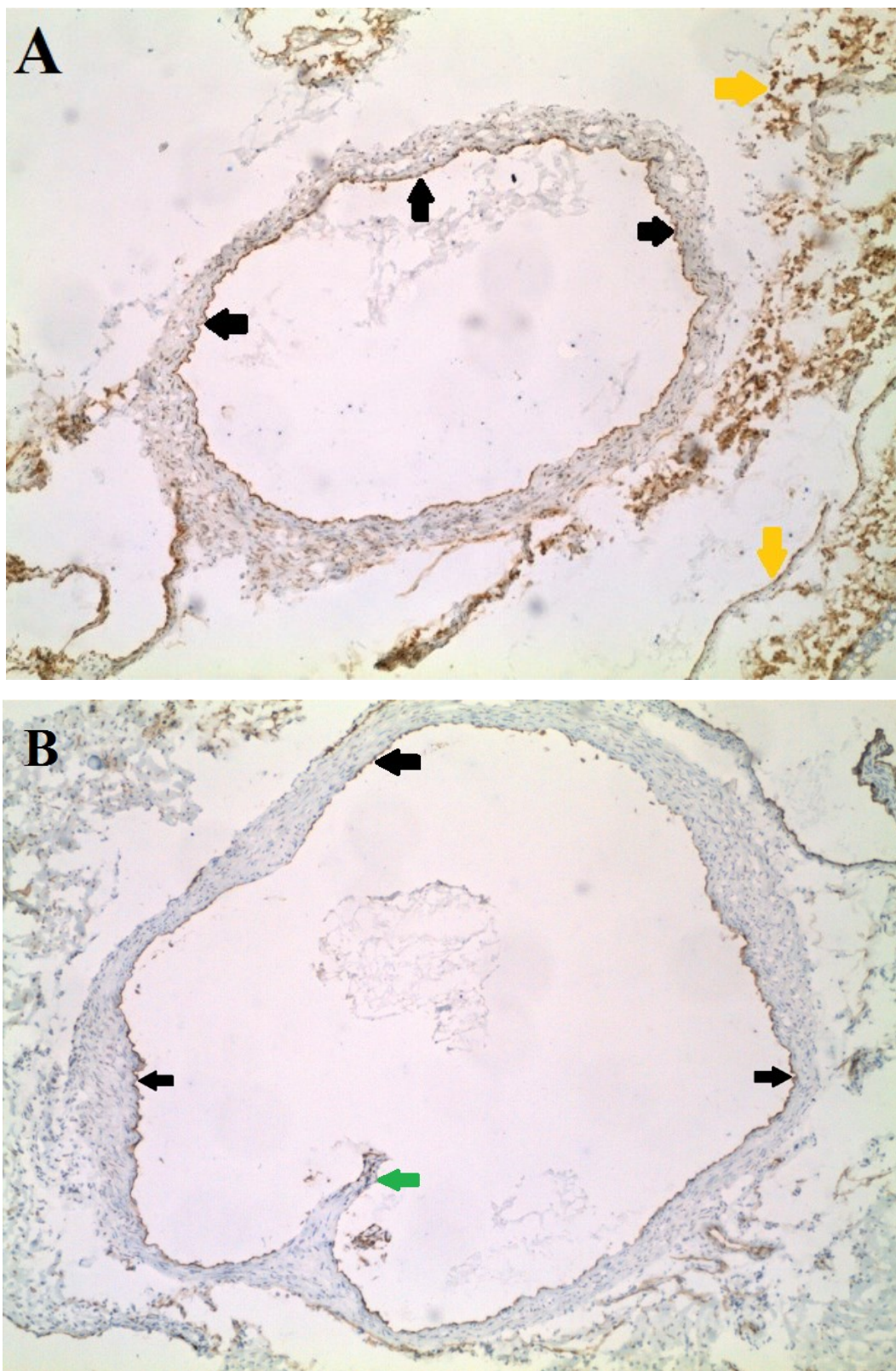
Obrázek 18: Exprese eNOS – kontrolní skupina

Na obrázcích 18 A a B je znázorněna exprese eNOS v aortě kontrolní skupiny myší, jež byla krmená standardní stravou. Černými šipkami je označena pozitivní (hnědě zbarvená) reakce na endotelu. Zelené šipky znázorňují zbytky aortálních poloměsíčitých chlopní. Oranžové šipky poukazují na pozitivní reakci v myokardu mimo aortu. Zvětšení 40×.



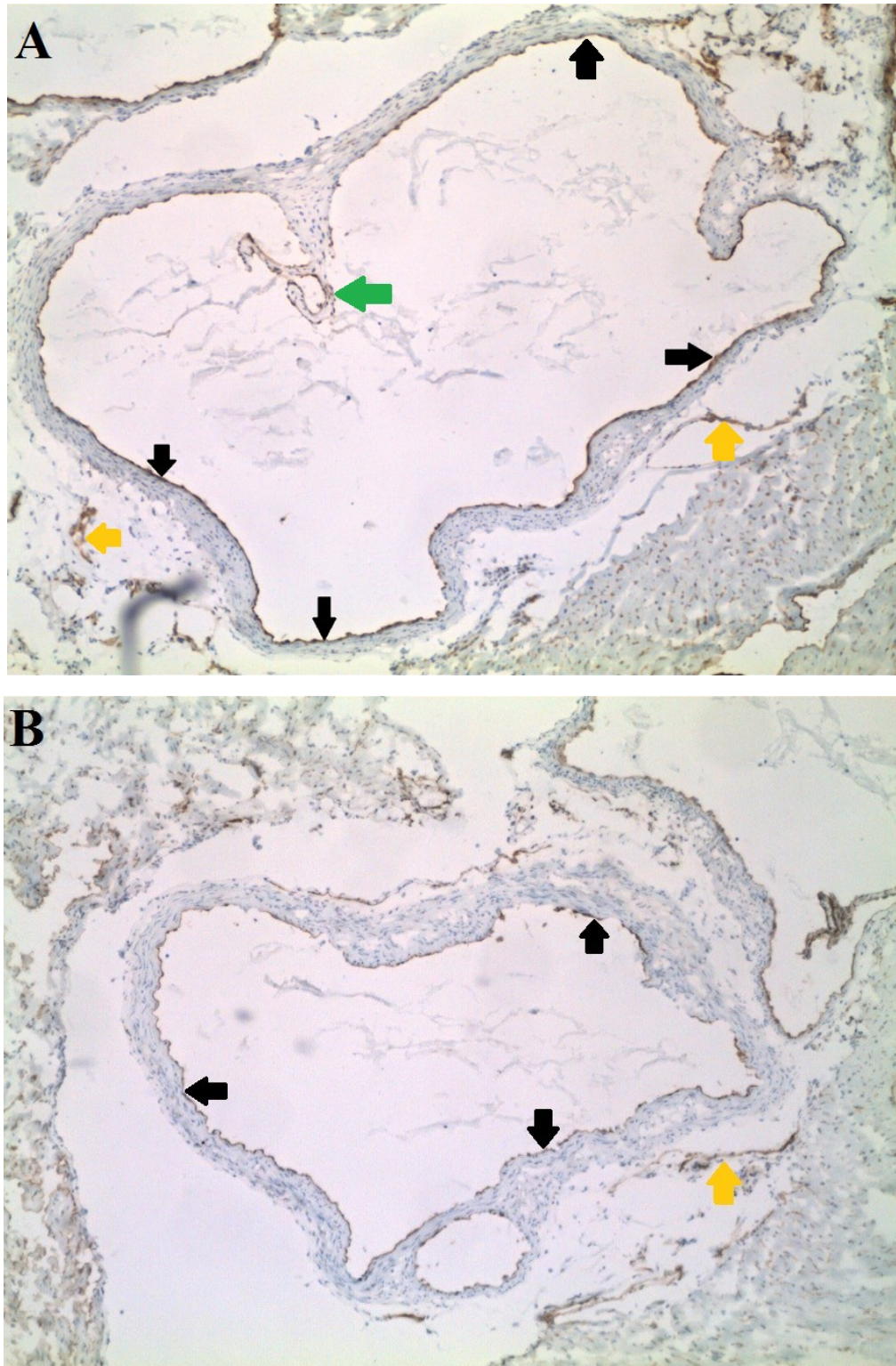
Obrázek 19: Exprese eNOS – kontrolní skupina

Na obrázcích 19 A a B je znázorněna exprese eNOS v aortě kontrolní skupiny myši, jež byla krmená standardní stravou. Černými šipkami je označena pozitivní (hnědě zbarvená) reakce na endotelu. Zelené šipky znázorňují zbytky aortálních poloměsíčitých chlopní. Oranžové šipky poukazují na pozitivní reakci v myokardu mimo aortu. Zvětšení 40×.



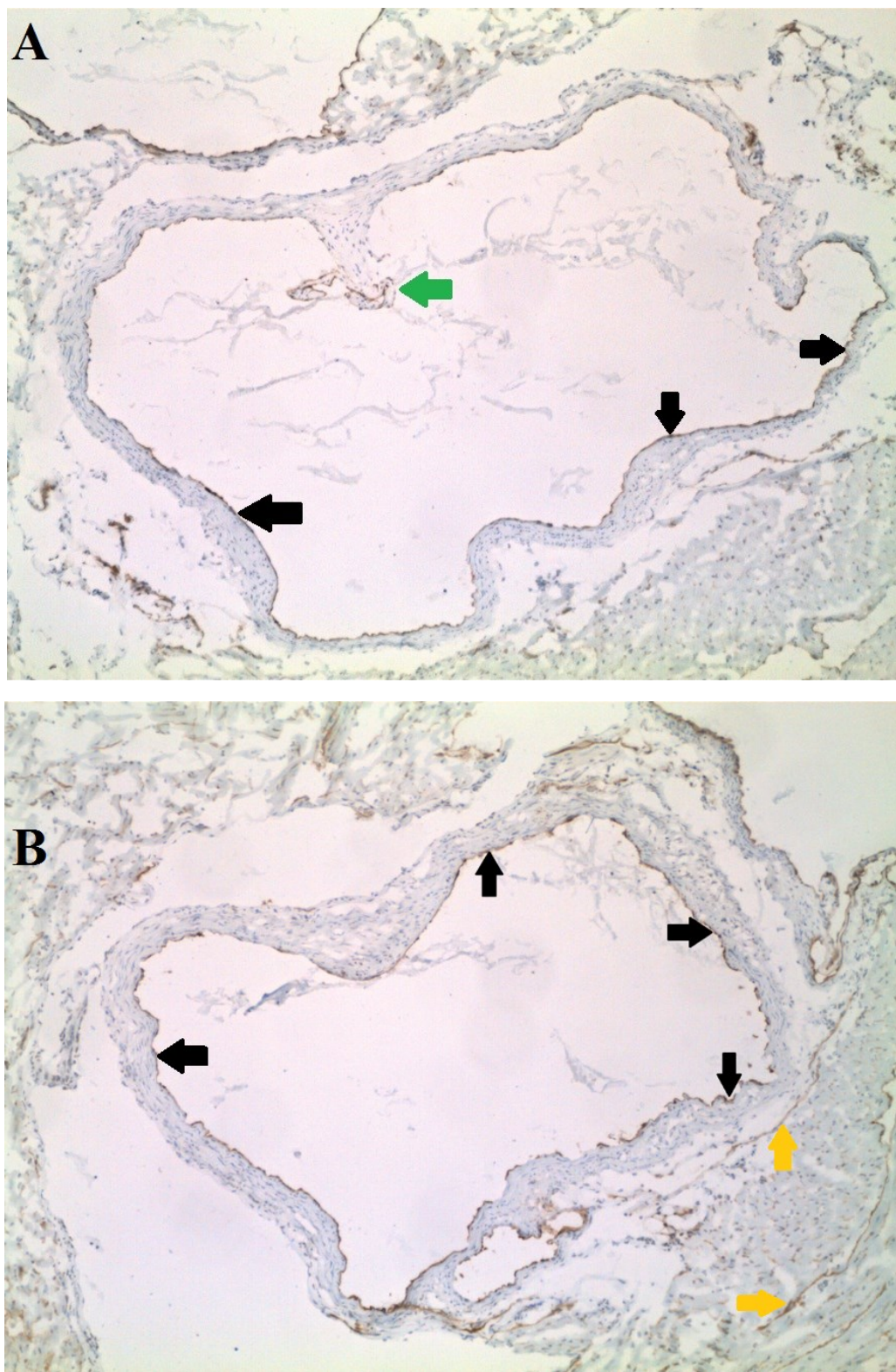
Obrázek 20: Exprese eNOS – experimentální skupina

Na obrázcích 20 A a B je znázorněna exprese eNOS v aortě experimentální skupiny myši, jež byla krmená vysokotukovou dietou. Černými šipkami je označena pozitivní (hnědě zbarvená) reakce na endotelu. Zelené šipky znázorňují zbytky aortálních poloměsíčitých chlopní. Oranžové šipky poukazují na pozitivní reakci v myokardu mimo aortu. Zvětšení 40×.



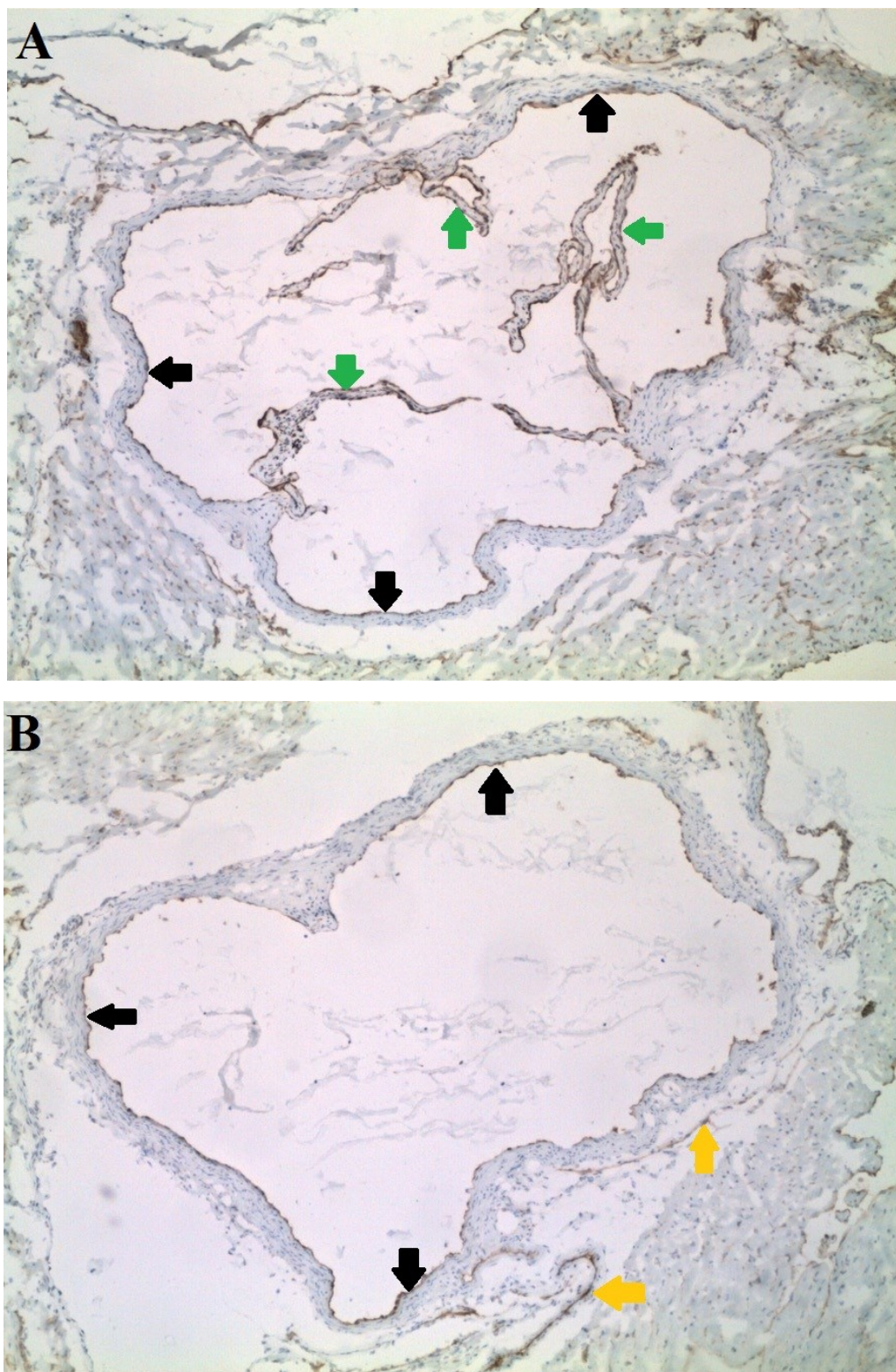
Obrázek 21: Exprese eNOS – experimentální skupina

Na obrázcích 21 A a B je znázorněna exprese eNOS v aortě experimentální skupiny myši, jež byla krmená vysokotukovou dietou. Černými šipkami je označena pozitivní (hnědě zbarvená) reakce na endotelu. Zelené šipky znázorňují zbytky aortálních poloměsíčitých chlopní. Oranžové šipky poukazují na pozitivní reakci v myokardu mimo aortu. Zvětšení 40×.



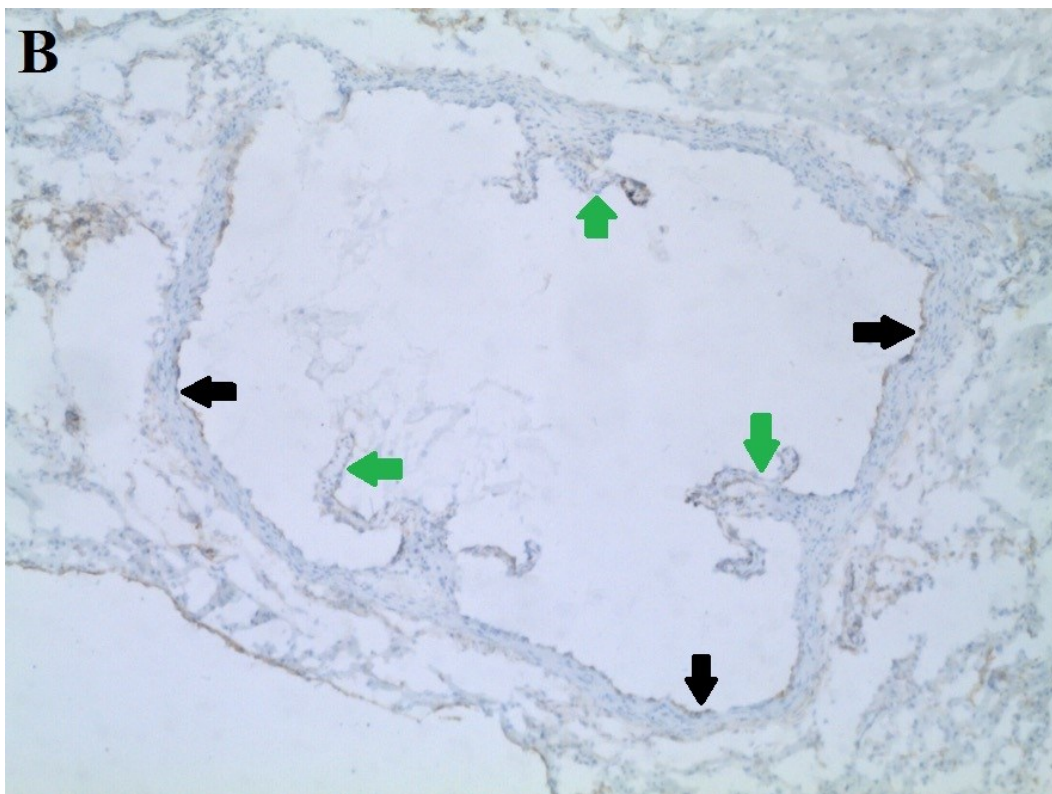
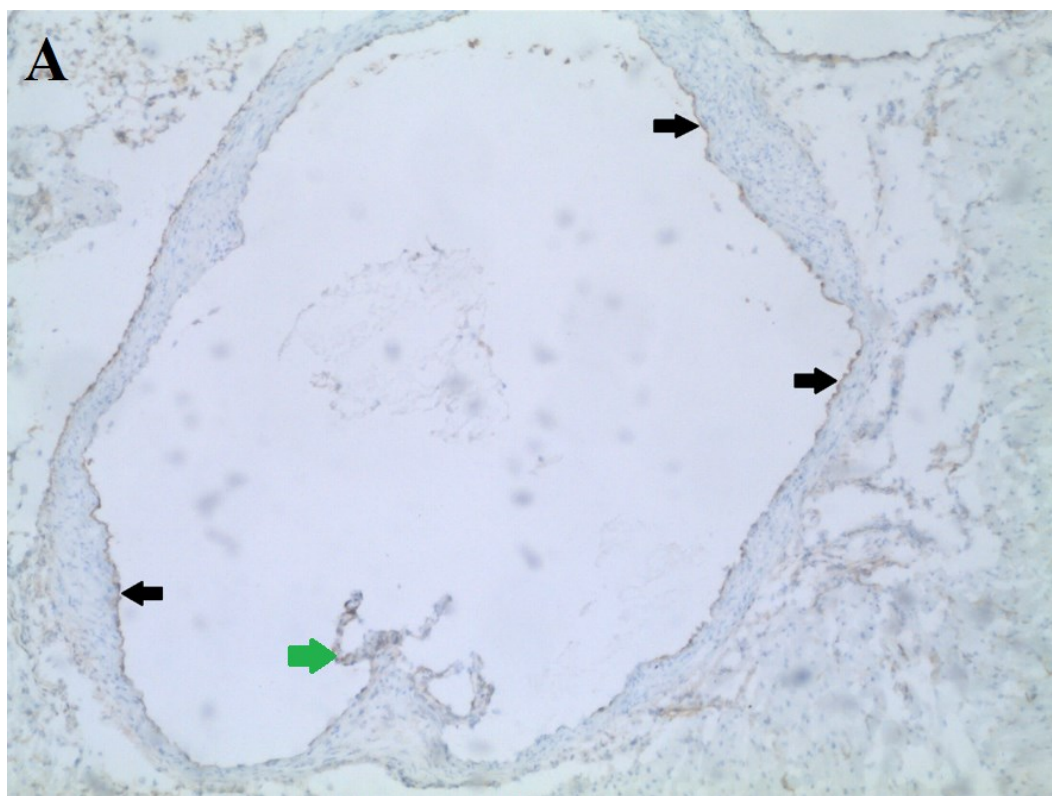
Obrázek 22: Expres eNOS – experimentální skupina

Na obrázcích 22 A a B je znázorněna exprese eNOS v aortě experimentální skupiny myši, jež byla krmená vysokotukovou dietou. Černými šipkami je označena pozitivní (hnědě zbarvená) reakce na endotelu. Zelené šipky znázorňují zbytky aortálních poloměsíčitých chlopní. Oranžové šipky poukazují na pozitivní reakci v myokardu mimo aortu. Zvětšení 40×.



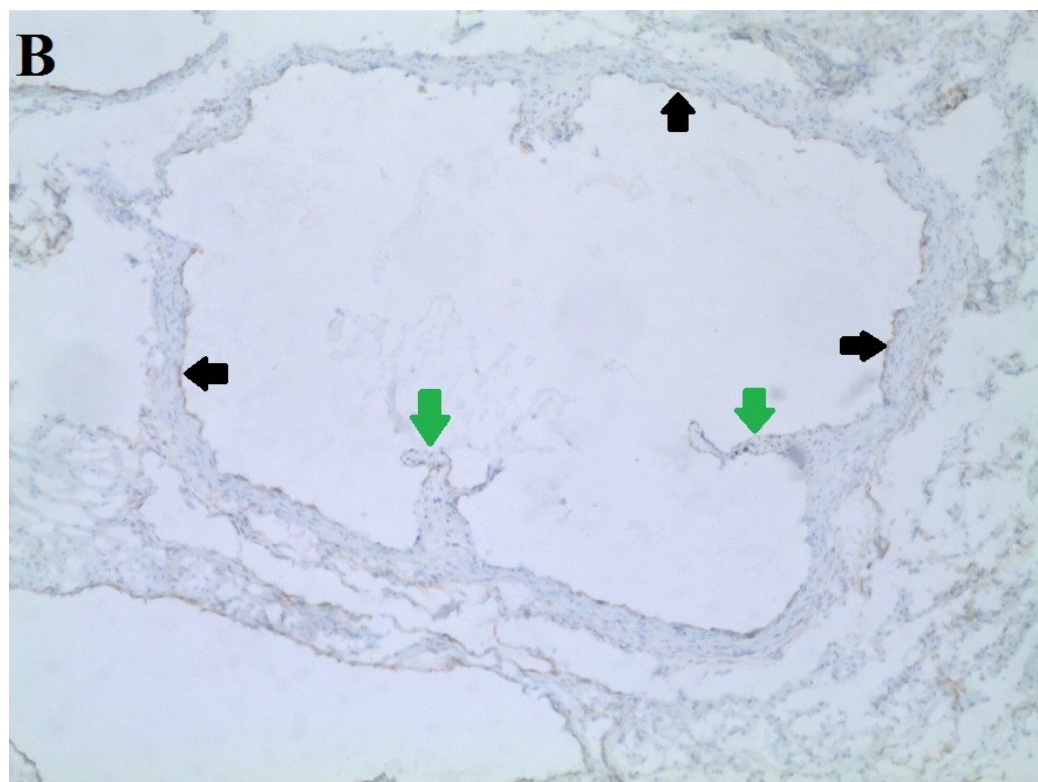
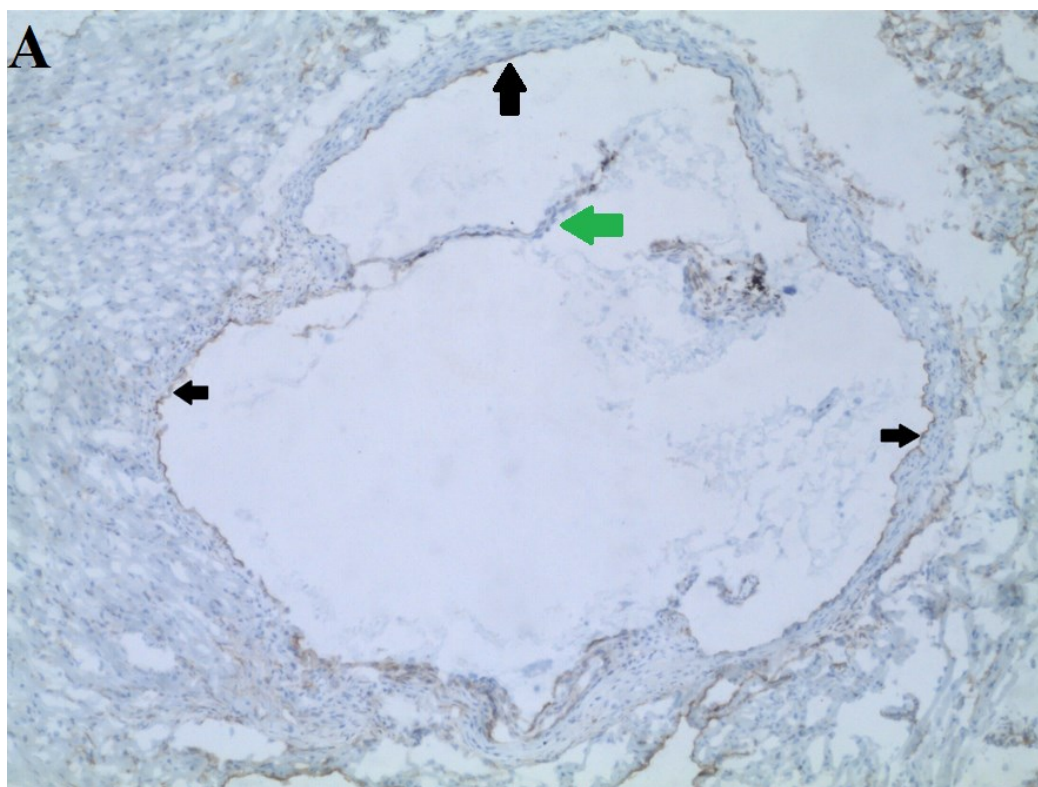
Obrázek 23: Exprese ICAM-1 – kontrolní skupina

Na obrázcích 23 A a B je znázorněna exprese ICAM-1 v aortě kontrolní skupiny myši, jež byla krmená standardní stravou. Černými šipkami je označena pozitivní (hnědě zbarvená) reakce na endotelu. Zelené šipky znázorňují zbytky aortálních poloměsíčitých chlopní. Zvětšení 40×.



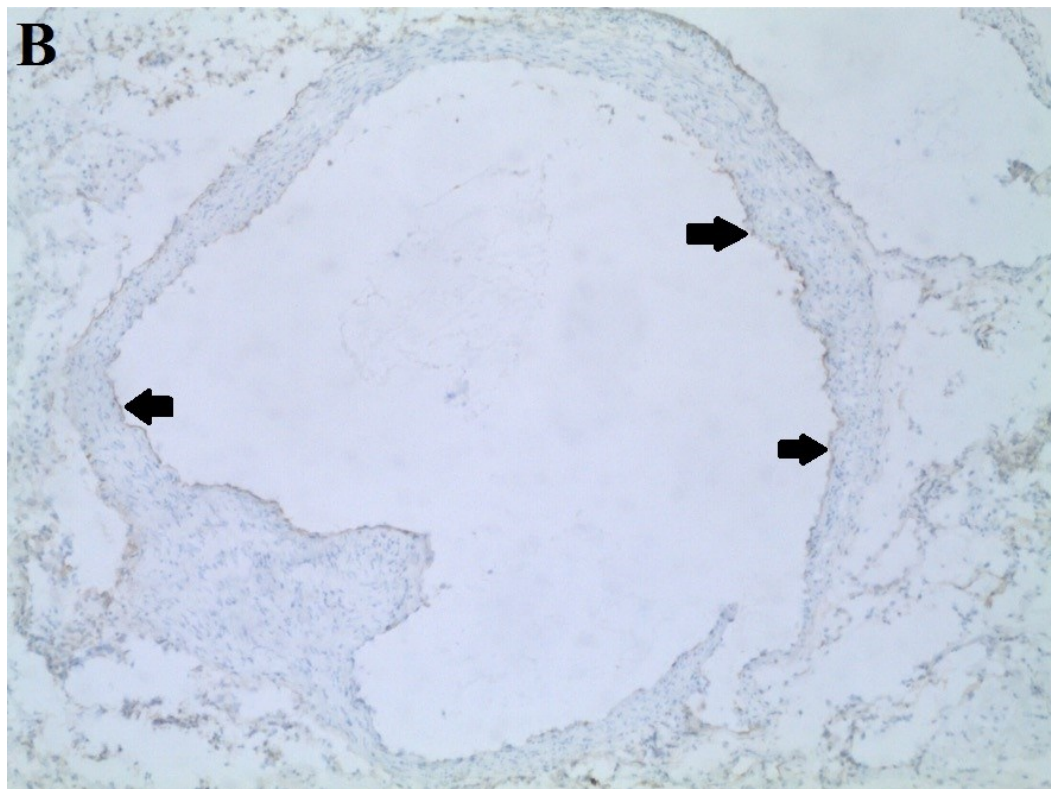
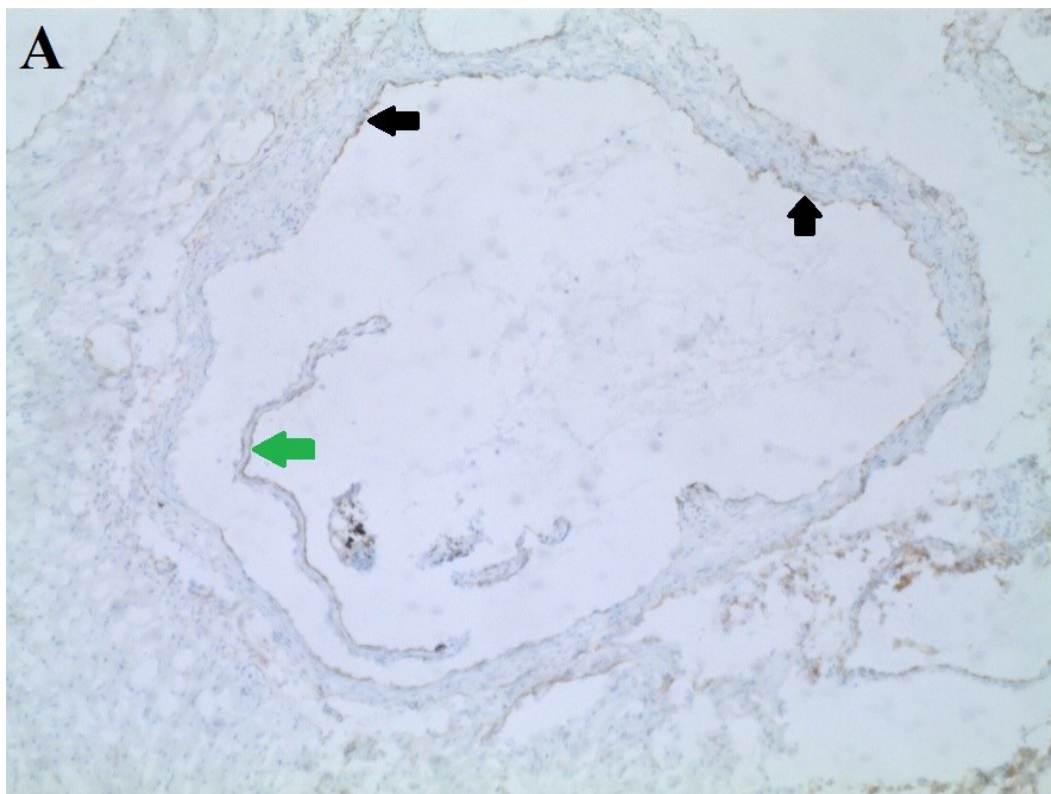
Obrázek 24: Exprese ICAM-1 – kontrolní skupina

Na obrázcích 24 A a B je znázorněna exprese ICAM-1 v aortě kontrolní skupiny myši, jež byla krmená standardní stravou. Černými šipkami je označena pozitivní (hnědě zbarvená) reakce na endotelu. Zelené šipky znázorňují zbytky aortálních poloměsíčitých chlopní. Zvětšení 40×.



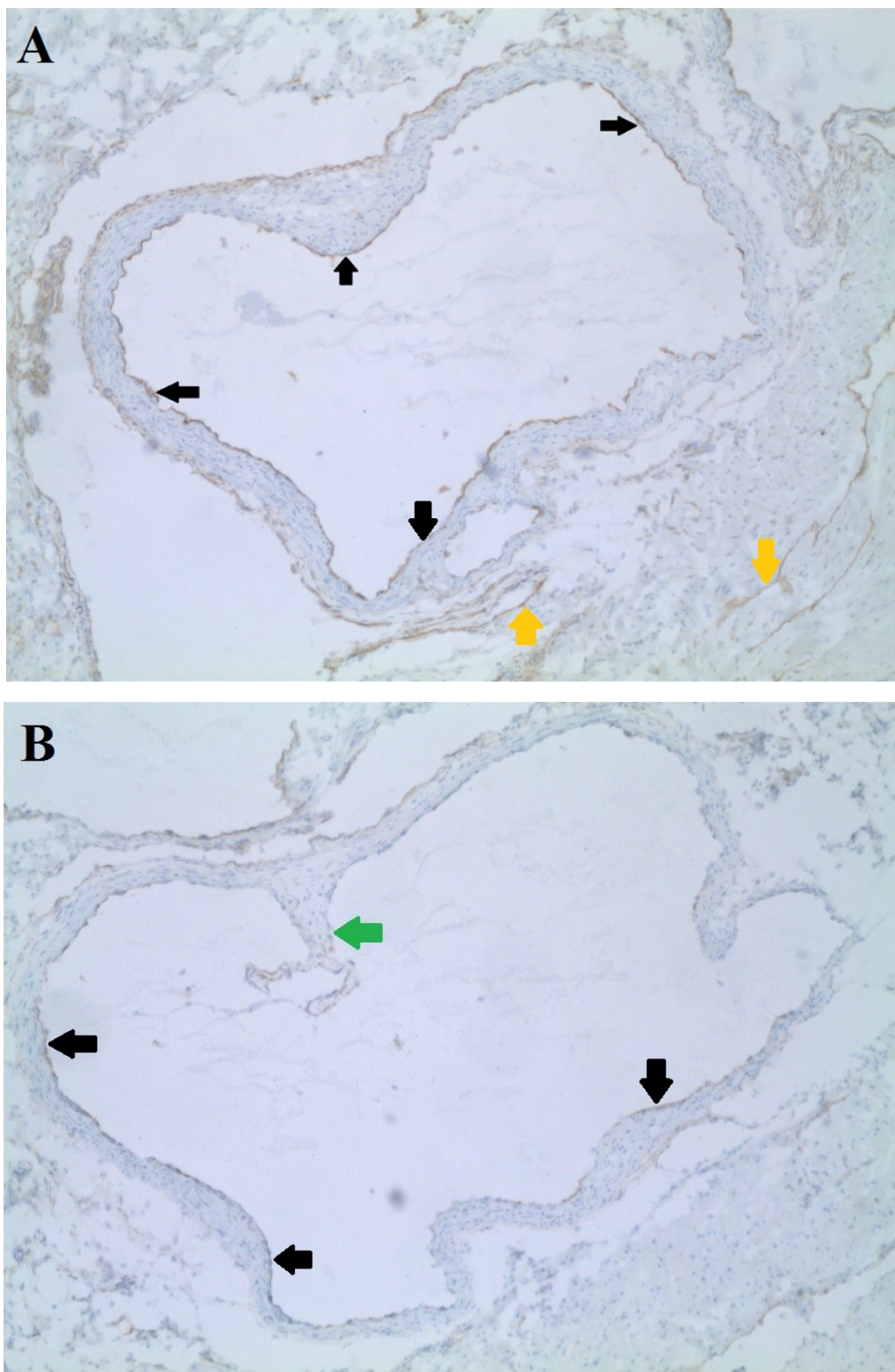
Obrázek 25: Exprese ICAM-1 – kontrolní skupina

Na obrázcích 25 A a B je znázorněna exprese ICAM-1 v aortě kontrolní skupiny myši, jež byla krmená standardní stravou. Černými šipkami je označena pozitivní (hnědě zbarvená) reakce na endotelu. Zelené šipky znázorňují zbytky aortálních poloměsíčitých chlopní. Zvětšení 40×.



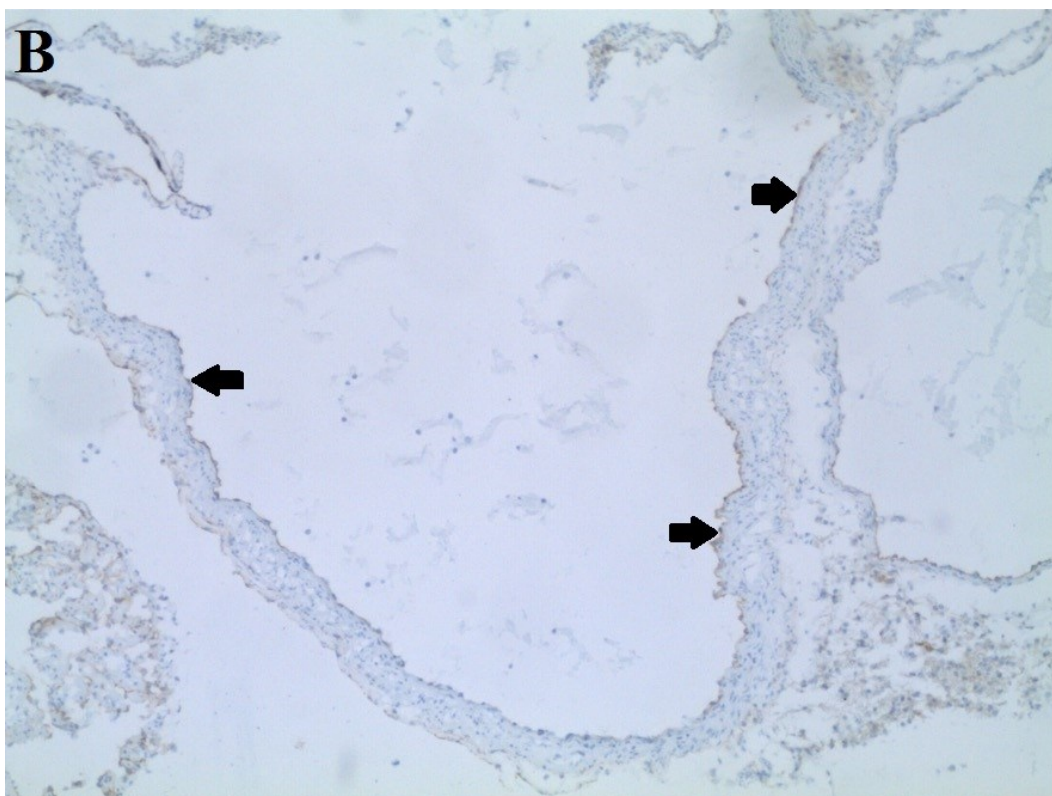
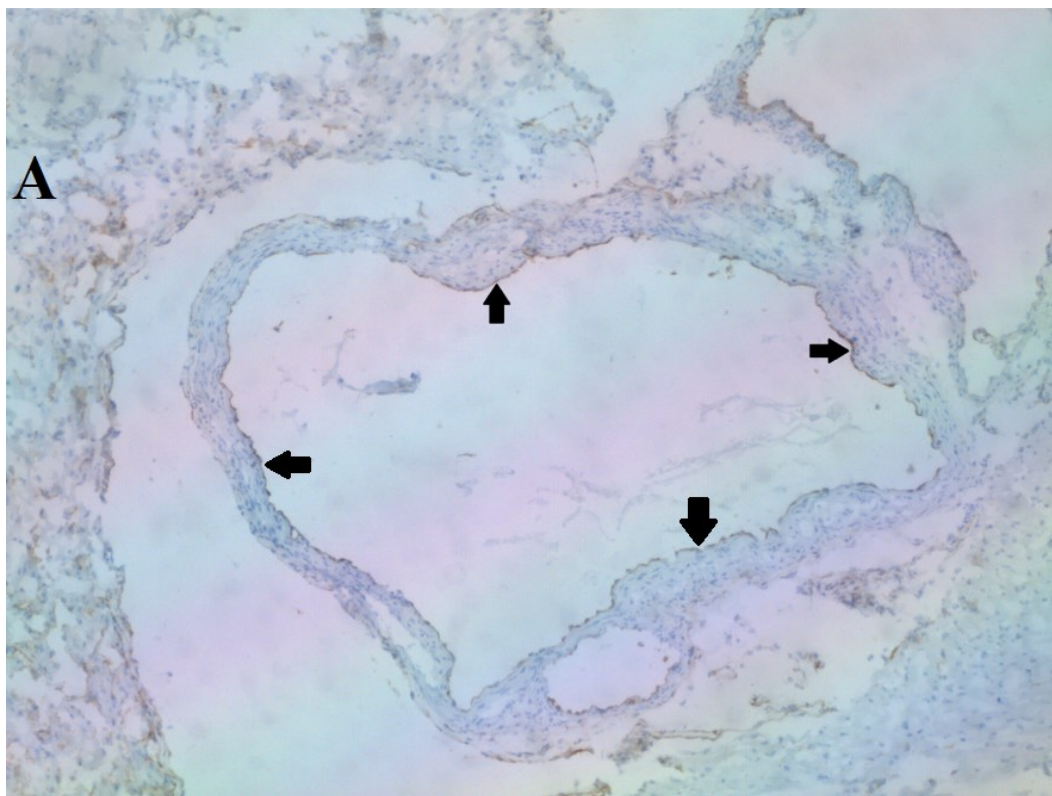
Obrázek 26: Expres ICAM-1 – experimentální skupina

Na obrázcích 26 A a B je znázorněna exprese ICAM-1 v aortě experimentální skupiny myši, jež byla krmená vysokotukovou dietou. Černými šipkami je označena pozitivní (hnědě zbarvená) reakce na endotelu. Zelené šipky znázorňují zbytky aortálních poloměsíčitých chlopní. Oranžové šipky poukazují na pozitivní reakci v myokardu mimo aortu. Zvětšení 40×.



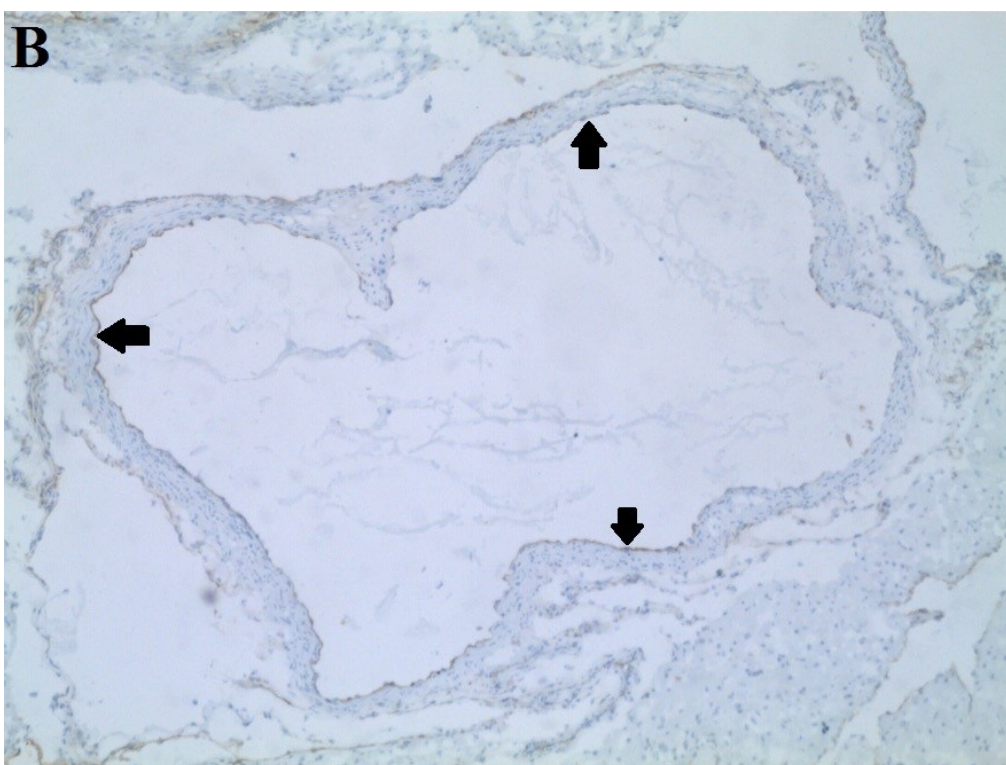
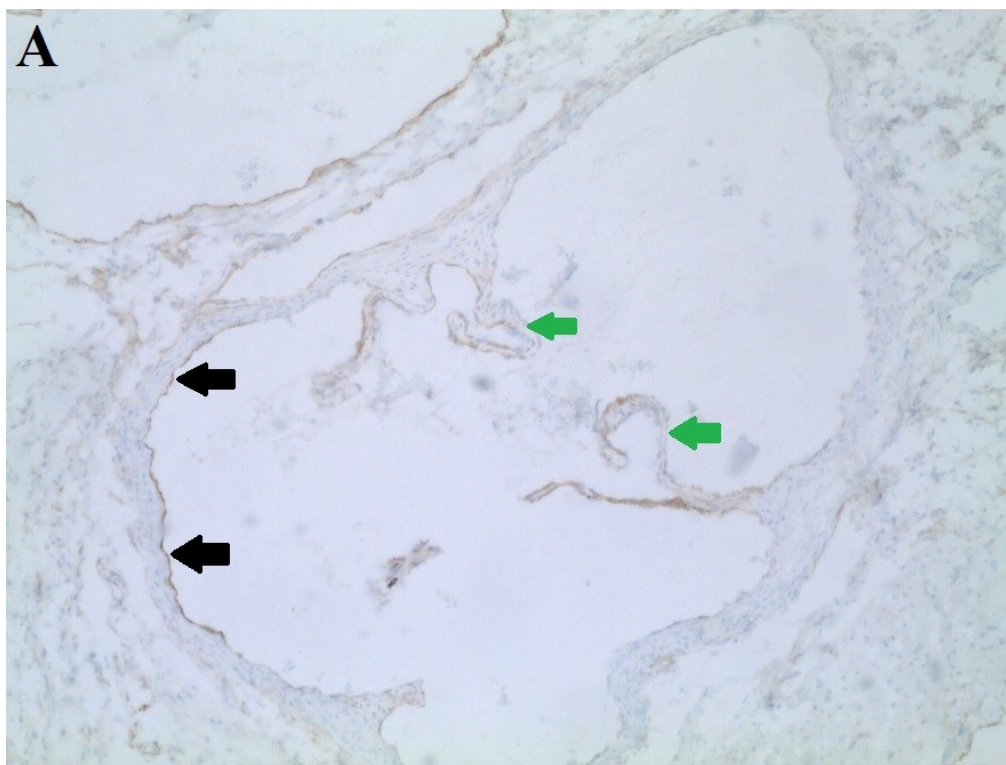
Obrázek 27: Exprese ICAM-1 – experimentální skupina

Na obrázcích 27 A a B je znázorněna exprese ICAM-1 v aortě experimentální skupiny myši, jež byla krmená vysokotukovou dietou. Černými šipkami je označena pozitivní (hnědě zbarvená) reakce na endotelu. Zvětšení 40×.



Obrázek 28: Exprese ICAM-1 – experimentální skupina

Na obrázcích 28 A a B je znázorněna exprese ICAM-1 v aortě experimentální skupiny myší, jež byla krmená vysokotukovou dietou. Černými šipkami je označena pozitivní (hnědě zbarvená) reakce na endotelu. Zelené šipky znázorňují zbytky aortálních poloměsíčitých chlopní. Zvětšení 40×.



12 Diskuze

Endotelová dysfunkce je závažný stav, jenž může vést k rozvoji život ohrožujících onemocnění, v první řadě se jedná o aterosklerózu. Ateroskleróza může vést k rozvoji ischemické choroby srdeční, která se manifestuje jako akutní infarkt myokardu, angina pectoris či ischemická choroba dolních končetin. Endotelová dysfunkce je tedy stav, jenž může vyústit ve vážné zdravotní komplikace²⁰. Mnoho studií proto sleduje vliv rozličných faktorů, protektivních či agresivních, na stav endotelu a jejich vliv na rozvoj případné dysfunkce. K tomuto účelu můžeme využít některé markery, mezi něž patří i eNOS a ICAM-1, tedy molekuly, jež byly imunohistochemicky sledovány v endotelu aorty myši v rámci této práce.

V této diplomové práci jsme se primárně zaměřili na sledování potenciálních změn exprese vybraných markerů endotelové dysfunkce u myši, kterým byla podávána standardní a vysokotuková dieta. Cílem bylo objasnit, zda tato vysokotuková dieta povede ke změnám exprese eNOS a ICAM-1 a zda tedy tento model může být vhodný pro další studium endotelové dysfunkce ve výzkumné skupině doc. Nachtigala.

eNOS je enzym, který umožňuje jednu ze základních funkcí endotelu, tedy produkci NO, jehož působením dochází mj. k vazodilataci. Mechanismus tohoto působení je založen na stimulaci činnosti guanylátcyklázy a následné aktivaci proteinkinázy. Výsledkem je snížení koncentrace intracelulárního vápníku¹⁶. Z dalších účinků NO jmenujme inhibici agregace destiček. Tímto působením NO brání rozvoji trombotických stavů¹⁷. Na základě těchto znalostí lze považovat eNOS za protektivní faktor v rozvoji aterosklerózy. V případě rozvoje endotelové dysfunkce vlivem dlouhodobého působení rizikových faktorů, především pak hypercholesterolémie, dochází k poklesu eNOS⁶⁷.

V této práci byla stanovována eNOS po podávání vysokotukové diety s obsahem 1,25 % cholesterolu a 40 % tuku po dobu 3 měsíců. Studie provedená na myších kmene C57BL/6 prokázala, že již během tří měsíců po podávání vysokotukové diety dochází k výraznému nárůstu hladin cholesterolu⁶⁸. Na základě těchto poznatků jsme tedy předpokládali, že exprese eNOS na endotelu aorty bude u myši krmených vysokotukovou dietou nižší.

Tento předpoklad se však nepotvrdil, exprese eNOS byla u obou skupin myší srovnatelná, rozdíly nebyly patrné. Je také nutné konstatovat, že pouhá změna exprese eNOS nutně nemusí znamenat změny ve funkci endotelu či v rozvoji endotelové dysfunkce. Takto bychom mohli měřit produkci NO cévním endotelem nebo změny exprese některých fosforylovaných forem eNOS jako např. fosforylovaná forma p-eNOS na Ser¹¹⁷⁷ (více viz kapitola 5.3 – Regulace aktivity eNOS)¹⁹.

ICAM-1 je adhezní molekula účastnící se adheze leukocytů k endotelu a jejich následnému průniku skrz endotel, čímž se účastní rozvoje zánětlivých reakcí, tedy i aterosklerózy. Dřívější studie prokázaly, že přítomnost ICAM-1 znamená vyšší riziko rozvoje aterosklerotických lézí, respektive že vyřazení genu pro ICAM-1 výskyt lézí snižuje^{31,69}. Zároveň bylo prokázáno, že při podávání diety s vysokým obsahem tuku (21 %) dochází ke zvýšení tvorby lézí⁵⁵.

Z výše uvedeného by se tedy dalo usuzovat, že podávání diety s obsahem 40 % tuku bude zvyšovat expresi ICAM-1, což posléze povede k tvorbě aterosklerotických plátů.

Nicméně výše zmíněné studie byly provedeny na ApoE-deficientních myších, zatímco my jsme v práci využili myši kmene C57BL/6 bez dalších modifikací. Máme ovšem k dispozici studii, která porovnávala expresi ICAM-1 mj. na cévním endotelu mezi ApoE-deficientními myšmi a kontrolní skupinou kmene C57BL/6. Obě skupiny byly krmeny stejnou dietou (s obsahem 21 % tuku a 0,15 % cholesterolu). Studie prokázala, že rozdíl v expresi ICAM-1 mezi kontrolní a ApoE-deficientní skupinou myší byl zanedbatelný⁷⁰. Z toho důvodu můžeme poznatky z výše zmíněných studií, provedených na ApoE-deficientních myších, aplikovat na náš model. Očekávali jsme tedy zvýšení exprese ICAM-1 na endotelu aorty ve skupině myší, jež byla krmena vysokotukovou dietou.

Výsledky imunohistochemické detekce ICAM-1 v aortě myší však neprokázaly signifikantní rozdíl v expresi této adhezní molekuly. Exprese byla u obou skupin myší srovnatelná a oproti eNOS méně výrazná. Tato data tedy naznačují, že změny exprese ICAM-1 nemusí nutně odrážet rozvoj endotelové dysfunkce.

Vzhledem k faktu, že exprese eNOS ani exprese ICAM-1 nevykazovala po 3měsíčním podávání vysokotukové diety významné rozdíly, lze předpokládat, že nedošlo k zaznamenanému rozvoji endotelové dysfunkce. Námi zvolený

experimentální model tedy zřejmě není pro daný design studie vhodný. Nelze samozřejmě vyloučit, že by při podávání dané diety po delší dobu nebo využití jiného zvířecího modelu byly výsledky odlišné.

13 Závěr

Tato diplomová práce byla zaměřena na stanovení exprese eNOS a ICAM-1 v aortě myši. Polovina myši kmene C57BL/6J byla krmena standardní stravou, polovina pak po dobu 3 měsíců dostávala vysokotukovou dietu s obsahem 1,25 % cholesterolu a 40 % tuku.

Imunohistochemická analýza prokázala výraznou expresi eNOS na endotelu aorty, avšak bez ohledu na podávanou stravu. Experimentální skupina vykazovala expresi stejnou jako skupina kontrolní.

Expresi ICAM-1 byla o poznání méně výrazná, ovšem i u této molekuly byla exprese v rámci obou skupin srovnatelná. Stejně jako eNOS se i ICAM-1 nacházel pouze na cévním endotelu.

Výsledky této práce tedy naznačují, že použití těchto myši a tohoto experimentálního designu nevede k manifestaci dysfunkce endotelu z pohledu morfologického nálezu.

14 Seznam obrázků a tabulek

Obrázek 1: Struktura arteriální stěny	13
Obrázek 2: Rozdíly ve struktuře cévní stěny arterie, vény a kapiláry	14
Obrázek 3: Funkce a dysfunkce endotelu	17
Obrázek 4: Struktura eNOS	19
Obrázek 5: Účinky NO	21
Obrázek 6: Vývoj aterosklerózy	25
Obrázek 7: Srovnání zdravé a aterosklerózou postižené cévy	26
Obrázek 8: Struktura jednotlivých skupin adhezních molekul	27
Obrázek 9: Rozdíl ve struktuře molekuly ICAM-1 a sICAM-1	31
Obrázek 10: Působení adhezních molekul	32
Obrázek 11: Srovnání dvou typů stravy u ApoE-deficientních myší	36
Obrázek 12: Přímá imunohistochemie	38
Obrázek 13: Nepřímá dvoustupňová imunohistochemie	39
Obrázek 14: Nepřímá trojstupňová imunohistochemie	39
Obrázek 15: Struktura molekuly imunoglobulinu	40
Obrázek 16: Struktura jednotlivých typů imunoglobulinu	41
Obrázky 17: Exprese eNOS – kontrolní skupina	50
Obrázky 18: Exprese eNOS – kontrolní skupina	51
Obrázky 19: Exprese eNOS – kontrolní skupina	52
Obrázky 20: Exprese eNOS – experimentální skupina	53
Obrázky 21: Exprese eNOS – experimentální skupina	54
Obrázky 22: Exprese eNOS – experimentální skupina	55
Obrázky 23: Exprese ICAM-1 – kontrolní skupina	56

Obrázky 24: Exprese ICAM-1 – kontrolní skupina	57
Obrázky 25: Exprese ICAM-1 – kontrolní skupina	58
Obrázky 26: Exprese ICAM-1 – experimentální skupina	59
Obrázky 27: Exprese ICAM-1 – experimentální skupina	60
Obrázky 28: Exprese ICAM-1 – experimentální skupina	61
 Tabulka 1: Rizikové faktory pro rozvoj endotelové dysfunkce	 23

15 Zdroje

¹ SLÍPKA, J. *Základy histologie*. Praha: Karolinum, 2014, s. 39. ISBN 978-80-246-2809-7.

² MARTÍNEK, J. a VACEK, Z. *Histologický atlas*. Praha: Grada, 2009, s. 11-12. ISBN 978-80-247-7007-9.

³ VALENTIJN, K. M., SADLER, E. J., VALENTIJN, J. A. *et al.* Functional architecture of Weibel-Palade bodies. *Blood journal*. 2011, 117(19). ISSN 1528-0020.

⁴ LÜLLMANN-RAUCH, R. *Histologie*. 3. vydání. Praha: Grada, 2012, s. 212-217. ISBN 978-80-247-3729-4.

⁵ ČIHÁK, R. *Anatomie 3*. 2. vydání. Praha: Grada, 2004, s. 25-37. ISBN 978-80-247-1132-4.

⁶ BERGERS, G. a SONG, S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro-oncology*. 2005, 7(4), 452-464.

⁷ VOJÁČEK, J. a MALÝ, M. *Arteriální a žilní trombóza v klinické praxi*. Praha: Grada, 2004, s. 21-31. ISBN 80-247-0501-X.

⁸ VISCHER, U. M. Von Willebrand factor, endothelial dysfunction and cardiovascular disease. *Journal of Thrombosis and Homeostasis*. 2006, 4(6), 1186-1193.

⁹ KARETOVÁ, D. Význam endotelu pro rozvoj kardiovaskulárních chorob. *Interní medicína pro praxi*. 2002, č. 3, 119-122.

¹⁰ POBER, J. S. a SESSA, W. C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nature Reviews – Immunology*. 2007, 7(10), 803-815.

-
- ¹¹ TRIPATHI, P., TRIPATHI P., KASHYAP, L. *et al.* The role of nitric oxide in inflammatory reactions. *FEMS Immunology and medical microbiology*. 2007, 51(3), 443-453.
- ¹² GELLER, D. A. a BILLIAR, T. R. Molecular biology of nitric oxide synthases. *Cancer and metastasis review*. 1998, 17(1), 7-23.
- ¹³ FÖRSTERMANN, U. a MÜNZEL, T. Endothelial Nitric Oxide Synthase in Vascular Disease: From Marvel to Menace. *Circulation*. 2006, 113(13), 1708-1714.
- ¹⁴ THÖNY, B., AUERBACH, G. a BLAU, N. Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions. *Biochemical society*. 2000, 347(1), 1-16.
- ¹⁵ LANDMESSER, U., DIKALOV, S., PRICE, R. S. *et al.* Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *The Journal of Clinical Investigation*. 2003, 111(8), 1201-1209.
- ¹⁶ HAYAKAWA, H., HIRATA, Y., KAKOKI M. *et al.* Role of nitric oxide-cGMP pathway in adrenomedullin-induced vasodilatation in the rat. *Hypertension*. 1999, 33(2), 689-693.
- ¹⁷ NAPOLI, C. Nitric oxide and atherosclerosis: An update. *Science Direct*. 2006, 15(4), 265-279.
- ¹⁸ ALDERON, W. K., COOPER, C. E. a KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*. 2001, 357(3), 593-615.
- ¹⁹ FULTON, D., GRATTON J.-P. a SESSA W. C. Post-Translational Control of Endothelial Nitric Oxide Synthase: Why Isn't Calcium/Calmodulin Enough? *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2001, 299(3), 818-824.
- ²⁰ CAI, H a HARRISON, D. G. Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The Role of Oxidant Stress. *Circulation Research*. 2000, 87(10), 840-844.

-
- ²¹ TADDEI, S., VIRDIS, A., GHIADONI, L. *et al.* Endothelial Dysfunction in Hypertension. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2001, 38(2), 11-14.
- ²² WILTZUM, J. L. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *The Lancet*. 1994, 344(8925), 793-795.
- ²³ ROSS, R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *The New England Journal of Medicine*. 1999, 340(2), 115-126.
- ²⁴ AMBROSE, J. A. a BARUA, J. S. The Pathophysiology of Cigarette Smoking and Cardiovascular Disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 2004, 43(10), 1731-1737.
- ²⁵ GOLÁŇ, L. Vliv kouření na morfologii a funkci kardiovaskulárního systému. *Interní medicína pro praxi*. 2007, 9(9), 386-388.
- ²⁶ JANÍČKOVÁ ŽĎÁRSKÁ, D. Diabetes mellitus ve vztahu ke kardiovaskulárním chorobám. *Interní medicína pro praxi*. 2005, 7(8), 332-335.
- ²⁷ WILLIAMS, J. K., ADAMS, M. R. a KLOPFENSTEIN, H. S. Estrogen modulates responses of atherosclerotic coronary arteries. *Circulation*. 1990, 81(5), 1680-1687.
- ²⁸ TEMPLE, M. E., LUZIER, E. B. a KAZIERAD, D. J. Homocysteine as a risk factor for atherosclerosis. *The Annals of Pharmacotherapy*. 2000, 34(1), 57-65.
- ²⁹ HALUZÍK, M. Homocystein jako rizikový faktor aterosklerózy. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2000, 2(7) [cit. 2017-01-22]. Dostupné z: <http://www.internimedicina.cz/artkey/int-200007-0006.php>
- ³⁰ GALKINA, E. a LEY, K. Vascular Adhesion Molecules in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2007, 27(11), 2292-2298.

-
- ³¹ COLLINS, R. G, VELJI, R., HICKS, M. J. *et al.* P-Selectin or Intercellular Adhesion Molecule (ICAM)-1 Deficiency Substantially Protects against Atherosclerosis in Apolipoprotein E-deficient Mice. *The Journal of Experimental Medicine*. 2000, 191(1), 189-194.
- ³² ETZIONI, A. Integrins: the molecular glue of life. *Hospital practice*. 2000, 35(3), 102-111.
- ³³ NACHTIGAL, P., GOJOVÁ, A. a SEMECKÝ, V. The role of epithelial and vascular-endothelial cadherin in the differentiation and maintenance of tissue integrity. *Acta Medica (Hradec Králové)*. 2001, 44(3), 83-87.
- ³⁴ WOODFIN, A., VOISIN, M. B. a NOURSHARGH, S. PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2007, 27(12), 2514-2523.
- ³⁵ CYBULSKY, M. I., IIYAMA, K., LI, H. *et al.* A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *The Journal of Clinical Investigation*. 2001, 107(10), 1255-1262.
- ³⁶ BLANKENBERG, S., BARBAUX, S. a TIRET, L. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2003, 170(2), 191-203.
- ³⁷ CYBULSKY, M. I., LICHTMAN A. H., HAJRA L. *et al.* Leukocyte adhesion molecules in atherogenesis. *Clinica Chimica Acta*. 1999, 286(1-2), 207-218.
- ³⁸ LAWSON, C. a WOLF, S. ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacological Reports*. 2009, 61(1), 22-32.
- ³⁹ HAIM, M., TANNE, D. a BOYKO, V. *et al.* Soluble Intercellular Adhesion Molecule - 1 and LongTerm Risk of Acute Coronary Events in Patients With Chronic Coronary Heart Disease. *Journal of American College of Cardiology*. 2002, 39(7), 1133-1138.

-
- ⁴⁰ WITKOWSKA, A. M. a BORAWSKA, M. H. Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1): an overview. *John Libbey Eurotext*. 2004, 15(2), s. 92.
- ⁴¹ IYAMA, K., HAJRA, L., IYAMA, M. *et al.* Patterns of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 and Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression in Rabbit and Mouse Atherosclerotic Lesions at Sites Predisposed to Lesion Formation. *Circulation Research*. 1999, 85(2), 199-207.
- ⁴² HUBBARD, A. K. a ROTHLEIN, R. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radical Biology and Medicine*. 2000, 28(9), 1379-1386.
- ⁴³ TEDGUI, A. a MALLA, Z. Cytokines in atherosclerosis: Pathogenic and regulatory pathways. *Physiological Reviews*. 2006, 86(2), 515-581.
- ⁴⁴ FROSTEGARD, J., ULFGREN, A. K., NYBERG, P. *et al.* Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: Dominance of pro-inflammatory (Th-1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis*. 1999, 145(1), 33-43.
- ⁴⁵ CHU, W. M. Tumor necrosis factor. *Cancer Letters*. 2013, 328(2), 222-225.
- ⁴⁶ MCKELLAR, G. E., MCCAREY, D. W., SATTAR, N. *et al.* Role for TNF in atherosclerosis? Lessons from autoimmune disease. *Nature Reviews Cardiology*. 2009, 6, 410-417.
- ⁴⁷ PESTKA, S., KRAUSE, C. D. a WALTER, M. R. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunological Reviews*. 2004, 202(1), 8-32.
- ⁴⁸ JAHNKE, A. a JOHNSON, J. P. Synergistic activation of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) by TNF- α and IFN- γ is mediated by p65/p50 and p65/c-Rel and interferon-responsive factor Stat 1 α (p91) that can be activated by both IFN- γ and IFN- α . *FEBS Letters*. 1994, 354(2), 220-226.

-
- ⁴⁹ DU CLOS, T. W. a MOLD, C. C-Reactive Protein. *Immunologic Research*. 2004, 30(3), 261-277.
- ⁵⁰ SINGH, U., DEVARAJ, S., VASQUEZ-VIVAR, J. *et al.* C – Reactive Protein Decreases Endothelial Nitric Oxide Synthase Activity via Uncoupling. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2007, 43(6), 780-791.
- ⁵¹ VENUGOPAL, S. K., DEVARAJ, S., YUHANNA, I. *et al.* Demonstration That C-Reactive Protein Decreases eNOS Expression and Bioactivity in Human Aortic Endothelial Cells. *Circulation*. 2002, 106(2), 1439-1441.
- ⁵² LUO, Y. a TALL, A. R. Sterol upregulation of human CETP expression in vitro and in transgenic mice by an LXR element. *The Journal of Clinical Investigation*. 2000, 105(4), 513-520.
- ⁵³ OKAMOTO, H. A cholesteryl ester transfer protein inhibitor attenuates atherosclerosis in rabbits. *Nature*. 2000, 406(6792), 203-207.
- ⁵⁴ BRESLOW, J. L. Mouse models of atherosclerosis. *Science*. 1996, 272(5262), 685-689.
- ⁵⁵ JAWIEN, J., NASTALEK, P. a KORBUT, R. Mouse models of experimental atherosclerosis. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2004, 55(3), 503-517.
- ⁵⁶ ZADELAAR, S., KLEEMANN, R., VERSCHUREN, L. *et al.* Mouse Models for Atherosclerosis and Pharmaceutical Modifiers. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 2007, 27(8), 1706-1721.
- ⁵⁷ POTTEAUX, S., AIT-OUFELLA, H. a MALLAT, Z. Mouse Models for Atherosclerosis. *Drug Discovery Today: Disease Models: Cardiovascular Diseases*. 2008, 4(4), 165-170.

⁵⁸ DELUNA, A. Mouse Models in Atherosclerosis. *Drug Discovery Today: Disease Models*. 2008, 5(3), 157-163.

⁵⁹ EICHNER, J. E., DUNN, S. T. a PERVEEN, G. *et al.* Apolipoprotein E Polymorphism and Cardiovascular Disease: A HuGE Review. *American Journal of Epidemiology*. 2002, 155(6), 487-495.

⁶⁰ DI ANGELANTONIO, E., YE, Z. a BENNET, A.M. Association of Apolipoprotein E Genotypes With Lipid Levels and Coronary Risk. *The Journal of American Medical Association*. 2007, 298(11), 1300-1311.

⁶¹ DAUGHERTY, A. Mouse models of atherosclerosis. *The American Journal of the Medical Sciences*. 2002, 323(1), 3-10.

⁶² MANCIOCCO, A. The application of Russell and Burch 3R principle in rodent models of neurodegenerative disease: The case of Parkinson's disease. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2009, 33(1), 18-32.

⁶³ DABBS, D. J. *Diagnostic Immunohistochemistry: Theranostic and genomic applications*. 4. vydání. Elsevier, 2014, s. 1-7. ISBN 978-1-4557-4461-9.

⁶⁴ BERANOVÁ, M. a TONAR Z. *Principy a příklady imunohistochemie* [online]. Plzeň, 2002 [cit. 2017-01-31]. Dostupné z: http://www.lfp.cuni.cz/Histologie/education/guides/ihc_hi_res.pdf. Ústav histologie a embryologie LF UK v Plzni.

⁶⁵ LIPMAN, N. S., JACKSON, L. R., TRUDEL, L. J. *et al.* Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources. *ILAR Journal*. 2005, 46(3), 258-268.

⁶⁶ RAMOS-VARA, J. A. a BENNET, A. M. Technical Aspects of Immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*. 2005, 42(4), 405-426.

⁶⁷ DAVIGNON, J. a GANZ P. Role of Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis. *Circulation*. 2004, 109(23), 27-32.

⁶⁸ EISINGER, K., LIEBISCH G. a SCHIMTZ G. Lipidomic Analysis of Serum from High Fat Diet Induced Obese Mice. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014, 15(2), 2991-3002.

⁶⁹ BOURDILLON, M. C., POSTON, R. N., COVACHO, C. *et al.* ICAM-1 Deficiency Reduces Atherosclerotic Lesions in Double-Knockout Mice (ApoE2/2/ICAM-12/2) Fed a Fat or a Chow Diet. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2000, 20(12), 2630-2635.

⁷⁰ NAKASHIMA, Y., RAINES, E. W., PLUMP, A. S. *et al.* Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at Atherosclerosis-Prone Sites on the Endothelium in the ApoE-Deficient Mouse. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1998, 18(5), 842-851.